



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY
A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

**OPTICKÉ MĚŘENÍ ELEKTROMECHANICKÝCH
PROJEVŮ SRDEČNÍCH BUNĚK**

OPTICAL MEASUREMENT OF ELECTROMECHANICAL CHARACTERISTICS OF HEART CELLS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Vratislav Čmíel

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

BRNO 2016

Abstrakt

Disertační práce se zabývá aplikací optických metod měření s využitím technik optické mikroskopie a fluorescenční mikroskopie při měření elektromechanických projevů izolovaných srdečních buněk a shluků diferencovaných kardiomyocytů. První navržená metoda využívá účelné kombinace fluorescenční mikroskopie s využitím rychlé fluorescenční kamery s vysokým rozlišením a mikroskopie atomárních sil pro současné měření vápníkových transientů a kontrakce shluků srdečních buněk. Získané signály prochází filtrací, zpracováním a analýzou. Výsledně získané funkční parametry kardiomyocytů získané analýzou signálů po aplikaci kofeinu jsou hodnoceny srovnáním s funkčními parametry získanými při kontrolním měření. Druhá navržená metoda je aplikována na shluky kardiomyocytů za účelem měření jejich kontrakce. Signály získané optickou metodou jsou analyzovány a výsledky porovnány s referenčním signálem získaným měřením s pomocí mikroskopie atomárních sil. Pro spolehlivější a stabilnější měření kontrakce v experimentech zaměřených na současné měření s vápníkovými transienty u izolovaných kardiomyocytů byly navrženy a realizovány optické metody měření kontrakce založené na detekci konců s využitím úpravy mikroskopického obrazu přeostrněním a s využitím fluorescenční metody měření.

Klíčová slova

Optické metody měření, mikroskopie atomárních sil, AFM, vápníkové transienty, cytosolická koncentrace vápníkových iontů, kontrakce kardiomyocytu, sarkoplasmatické retikulum, akční napětí, kontraktilní aparát, kardiomyocyty, iPSC-CM, EB

Abstract

Dissertation is focused on the application of optical measurement methods using techniques of optical microscopy and fluorescence microscopy in measurements of electromechanical characteristics of isolated cardiac cells and clusters of differentiated cardiomyocytes. The first proposed method uses a practical combination of fluorescence microscopy equipped with fluorescent fast and high-resolution camera and atomic force microscopy for simultaneous measurement of calcium transients and contraction of cardiomyocyte clusters. The signals obtained undergoes filtration, processing and analysis. Result function parameters obtained by analyzing signals after application of caffeine are evaluated by comparison with functional parameters obtained during the control measurement. The second proposed method is applied to the cardiomyocyte clusters for the purpose of cardiomyocyte contraction signals measurement. The signals obtained by optical methods are analyzed and compared with the reference signal obtained using atomic force microscopy. Optical measurement method of cell contractions based on detection of cell ends using adjusting of microscopy images by re-sharpening and fluorescence method for cardiomyocyte contractions measurements were designed to increase reliability in simultaneous measurement of cell contractions simultaneously with calcium transients in isolated cardiomyocytes experiments.

Abstract

Optical measurement methods, atomic force microscopy, AFM, calcium transients, calcium cytosolic concentration, cardiomyocyte contraction, sarcoplasmatic retikulum, action potential, contractile apparatus, cardiomyocyte, iPSC-CM, EB

ČMIEL, V. *Optické měření elektromechanických projevů srdečních buněk*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2016. 163 s. Vedoucí dizertační práce prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem dizertační práci na téma OPTICKÉ MĚŘENÍ ELEKTROMECHANICKÝCH PROJEVŮ SRDEČNÍCH BUNĚK vypracoval samostatně s použitím odborné literatury a pramenů, uvedených na seznamu, který je součástí této práce.

V Brně dne

.....
Ing. Vratislav Čmíel

Poděkování

Děkuji svému školiteli prof. Ing. Ivo Provazníkovi, Ph.D. za jeho dlouhodobé odborné vedení v průběhu mého doktorského studia, podporu a důvěru spojenou s dizertační prací.

Dále bych chtěl poděkovat za dlouhodobou dřívější spolupráci panu Peteru Matejovičovi z Pracovní skupiny Buněčná elektrofyziologie LF MU, dále za současnou, velmi vstřícnou a hodnotnou pomoc ve spolupráci doktoru Martinu Pešlovi a doktoru Janu Příbylovi z LF MU a také Ing. Tomáši Potočňákovi za významnou odbornou podporu. V neposlední řadě velmi děkuji rodině za podporu a své manželce za velkou podporu a uvolnění značného časového prostoru pro zpracování práce.

Obsah

Úvod	8
1 Elektromechanické projevy srdečních buněk	11
1.1 Srdeční buňky	11
1.2 Srdeční aktivita a vazba excitace-kontrakce	13
1.3 Signály vazby excitace-kontrakce	14
2 Metody měření elektromechanických projevů srdečních buněk.....	18
2.1 Optické metody měření kontrakce	18
2.2 Holografická mikroskopie.....	24
2.3 Mikroskopie atomárních sil	24
2.4 Impedanční metoda	26
2.5 Metody měření vápníkových transientů	27
2.6 Metody měření akčního napětí.....	29
3 Cíle práce	34
4 Optické metody měření.....	35
4.1 Světelná a fluorescenční mikroskopie	35
4.2 Kontrastní techniky	38
4.3 Obrazové snímáče	39
4.4 Současné měření více parametrů.....	42
4.5 Prostorová separace kanálů	44
5 Návrh a realizace systému pro vícekanálové měření	49
5.1 Optické metody	50
5.2 Kombinace s kontaktními metodami	53
5.3 Návrh a realizace vícekanálového systému.....	53
5.3.1 Optický rozbočovač s využitím dvou kamer	54
5.3.2 Praktická realizace – optický systém promítání obrazů na jeden snímáč	58
6 Hodnocení získaných dat	60
6.1 Hodnocení signálů	62
6.2 Hodnocené parametry	63
7 Praktická část A – Současné měření $[Ca^{2+}]_i$ a kontrakce iPSC-CM	68
7.1 Akvizice dat.....	68
7.2 Měření vápníkových transientů	71
7.3 Měření kontrakce s využitím AFM.....	73
7.4 Hodnocení vlastností filtrace.....	76
7.5 Ověření filtrace a analýzy signálů při aplikaci kofeinu	82
7.5.1 Analýza změn v signálu kontrakce.....	82
7.5.2 Analýza změn u signálu vápníkových transientů.....	89
7.6 Diskuse k výsledkům.....	94
7.6.1 Potlačení šumu	95
7.6.2 Negativní vlivy filtračních metoda na užitečný signál	95
7.6.3 Vliv na vzdálenosti detekovaných špiček a jejich maximálních hodnot.....	96
7.6.4 Vliv kofeinu na funkční parametry	97
8 Praktická část B – Optické měření kontrakce iPSC-CM (EB)	98
8.1 Algoritmus pro měření kontrakce a hodnocení signálů	101
8.2 Výsledky.....	105

8.2.1	Srovnání vlivu výběru oblasti	108
8.3	Difrakční metoda.....	113
8.4	Diskuse	119
9	Praktická část C – Optické metody měření kontrakce kardiomyocytů.....	122
9.1	Technické řešení zařízení.....	122
9.2	Měření kontrakce izolovaných kardiomyocytů	123
9.3	Měření vápníkových transientů u izolovaných kardiomyocytů	125
9.4	Současné měření kontrakce a $[Ca^{2+}]_i$	126
9.5	Metoda detekce konců	127
9.6	Fluorescenční metoda měření kontrakce	131
9.6.1	Hodnocení tvarových parametrů při kontrakci	133
9.6.2	Barvení kardiomyocytů	138
9.7	Diskuse	140
10	Závěr	142
11	Seznam literatury.....	144
	Seznam obrázků	152
	Seznam zkratk	161
	Příloha 1.....	162

Úvod

Disertační práce nesoucí název Optické měření elektromechanických projevů srdečních buněk se zaměřuje na návrh a realizaci bezkontaktních optických metod pro sledování elektrofyzilogických procesů nastávajících u srdečních buněk v rámci spřažení excitace-kontrakce, a to zejména s využitím mikroskopie světlého pole, fluorescenční mikroskopie, mikroskopie atomárních sil s pomocí rychlých digitálních kamer. Disertační práce si klade za cíl nalézt vhodné metody optického měření elektromechanických projevů srdečních buněk, jejich kombinace a nastavení, přičemž jsou tyto metody v použity buď samostatně, anebo současně s dalšími specializovanými, ale kontaktními, metodami. Ve velké míře se práce zaměřuje na možnosti simultánního měření více elektrofyzilogických parametrů optickou cestou, což umožňuje hlubší analýzu dynamických dějů v buňkách.

Optické metody měření využívající optickou světelnou mikroskopii jsou v současné době velice rozšířené a nabízí množství aplikací. Využívají základní možnosti tradiční optické mikroskopie (zejména zobrazení ve světlem poli), rozšířenou a technicky pokročilou fluorescenční mikroskopii, a další specializované techniky. Příkladem jsou konfokální mikroskopie s rozμίtaným laserovým paprskem (rastrovací konfokální mikroskopie), mikroskopie s fázovým kontrastem (fázová mikroskopie), polarizační mikroskopie, FLIM (Fluorescence-lifetime imaging microscopy), FRET (Fluorescence resonance energy transfer) mikroskopie, TIRF (Total internal reflection fluorescence microscopy), a další. Rozšíření a uplatnění uvedených mikroskopických zobrazovacích metod přímo souvisí s postupným a velmi rychlým rozvojem v oblasti optiky a snímacích technologií, zejména v oblasti rychlých nízkošumových obrazových snímačů. V případě výzkumu elektromechanických projevů kardiomyocytů nachází optické metody měření také svoje uplatnění. Hrají velice významnou úlohu v případech měření dějů spojených se signalizačními procesy vápníkových iontů probíhajících v intracelulárním prostředí kardiomyocytů, kde jsou jedinou bezkontaktní variantou měření. Sledovanými ději mohou být elementární děje zvané vápníkové jiskry, které jsou lokálními projevy vápníkových procesů, anebo rozšířené děje, spjaté s časově-prostorovými změnami v buňkách. Významným procesem jsou vápníkové transienty, které jsou souhrnem elementárních dějů a poukazují na celkovou vápníkovou aktivitu v procesu excitace-kontrakce. Sledování vápníkových dějů v buňce probíhá s využitím fluorescenční mikroskopie nebo specializovaných technik založených na fluorescenční mikroskopii (zejména jde o konfokální fluorescenční mikroskopii) pomocí vápníkových fluorescenčních indikátorů. Pro měření ostatních projevů kardiomyocytů spřažení excitace-kontrakce jsou využívány povětšinou tradiční kontaktní metody, a to zejména v případě měření elektrických projevů – sledování změn akčního napětí. Pro tyto účely je dlouhodobě používána metoda patch-clamp anebo aktuálně mikroelektrodová pole, která s sebou nesou i výhody možnosti měření prostorových šíření akčního napětí v tkáni. Optické metody naopak nachází velice časté uplatnění při zkoumání mechanických projevů srdečních buněk. Děje se tak zejména v případě izolovaných jednotek - enzymaticky izolovaných kardiomyocytů nebo shluků buněk.

Obecně vzato, mezi hlavní výhody optických metod měření elektromechanických projevů kardiomyocytů patří absence kontaktu s měřenými objekty a tím i eliminace nutnosti nebo možnosti jejich poškození (například protržení membrány). Další výhody lze najít v případě experimentů typu High-content screening (HCS) anebo High-throughput screening (HTS). Jde o experimenty, kde je prováděno současné měření rozsáhlejšího souboru objektů (s využitím vícejamkové misky nebo v případě více objektů v jednom zorném poli), anebo je potřeba velký soubor měřených objektů nutné zpracovat v krátkém časovém úseku. Optické metody jsou již dlouhou dobu (zhruba po 4 desetiletí) využívány pro měření a sledování kontrakcí izolovaných dospělých kardiomyocytů. U shluků buněk,

konkrétně v případě shluků iPSC kardiomyocytů je však mnohem častěji využívána mikroskopie atomárních sil. V tomto konkrétním případě jsou optické metody využívány pro měření vápníkových dějů, kde uplatňují své výhody v současném měření spolu s kontaktní metodou AFM. Takovýmto příkladem se zabývá jedna z praktických částí.

Disertační práce se zabývá návrhem a realizací optických metod měření pro dva typy kardiomyocytů. Jsou to izolované srdeční buňky dospělého potkana a funkční shluky, tzv. embryodická tělesa (EB), pluripotentních kardiomyocytů (iPSC-CM). Těmito skupinami buněk se práce zabývá v první kapitole. První kapitolu doplňuje popis procesů srdeční aktivity, zejména procesů spojených s vazbou excitace-kontrakce, a jejich výstupů ve formě signálů, na jejichž měření jsou jednotlivé celky praktické části orientovány. Druhá kapitola se orientuje na optické metody měření a jejich dosud publikované varianty a uplatnění. Předkládá přehled používaných metod s uvedením jejich variant a dosaženého stupně ve vývoji. Čtvrtá kapitola navazuje problematikou techniky světelné a fluorescenční mikroskopie a variantami realizace elektrické, mechanické a optické částí systému pro měření s využitím optických metod. V neposlední řadě se teoretická část práce, konkrétně v kapitole páté, věnuje problematice vícekanálového měření, která je podstatná pro zajištění měření více fyziologických parametrů srdečních buněk současně. Uvedené kapitoly tvoří základní teoretický podklad práce pro realizaci metod měření.

Šestá kapitola uvádí přehled navržených optických metod a dále se zaměřuje na postupy v hodnocení dat funkčních parametrů získaných analýzou a rozměřením signálů. Realizaci navržených metod se zabývají kapitoly tři praktické části značené A, B a C umístěné v kapitolách 7 – 9.

První praktická část v kapitole 7 popisuje aplikaci kombinace optických metod měření a kontaktního měření s využitím mikroskopie atomárních sil (AFM). Jedná se o využití metod v experimentu typu tzv. „drug screening“ (DS). DS vyjadřuje problematiku aplikace léčiv na buněčné modely, jednotlivé srdeční buňky či srdeční tkáň se zájmem o sledování změn celé řady parametrů ve vazbě excitace-kontrakce vlivem aplikovaných chemických látek. Těmi mohou být různá farmaka, ať už léčiva, anebo cytotoxické látky. Zařízení AFM spolu s optickým měřením je v experimentu využito k simultánnímu měření kontraktilní síly a vápníkových transientů u iPSC-CM, konkrétně u těles EB. Signály jsou podrobeny třem odlišným typům filtrací, kdy jsou jejich vlastnosti a dosažené výsledky získané po aplikaci odlišných přístupů filtrací, porovnány. Použité metody filtrace mají přímý vliv na hodnocené funkční parametry získané analýzou (rozměřením) signálů a jsou v publikacích často opomíjeny. V této části je realizována podrobná analýza signálů, konkrétně jsou signály podrobeny detekci stěžejních bodů a následnému rozměření na jednotlivé fáze spojené s funkcemi kontrakce a relaxace kardiomyocytů anebo spojenými s procesy vápníkových cyklů v buňkách. Cílem je ukázat míru změn, které testováním látky v rámci této aplikační části nastávají a poukázat na parametry, u kterých se tato změna projevuje. V závěrečné fázi jsou porovnány a zhodnoceny změny v získané funkční parametry a vyvozeny změny, které nastaly vlivem kofeinu na funkce měřeného objektu.

Druhá praktická část B umístěná v kapitole 8 se podrobně zabývá možností využití optických metod pro bezkontaktní měření kontrakce iPSC kardiomyocytů (EB těles). K tomuto účelu je téměř výhradně používáno u nás i ve světě metoda mikroskopie atomárních sil, která přináší své nesporné výhody, zejména v možnostech délky pořízených záznamů a při tom zajištěnou vysokou vzorkovací frekvencí. Cílem bylo analyzovat několik vyvinutých postupů, v logické návaznosti na znalosti u optického měření kontrakce izolovaných kardiomyocytů, a zhodnotit celkové možnosti měření kontrakční síly EB opticky, v porovnání s referenčním signálem AFM. Data jsou získána simultánně. Důraz je kladen také na rozbor podmínek a vnější vlivů, které optické měření ovlivňují. Příkladem může být morfologie EB anebo volba oblastí zájmu při měření. Pro práci za náročnějších podmínek je

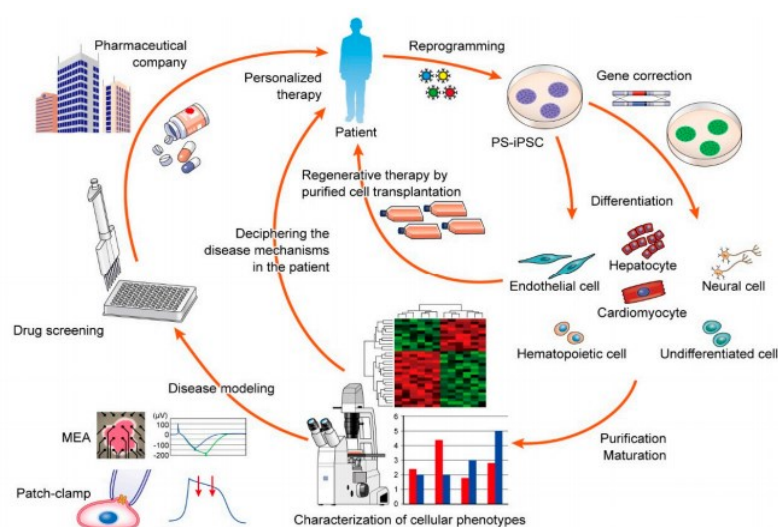
představena vyvinutá difrakční metoda, která využívá laserového IR zdroje používaného v AFM zařízení.

Třetí praktická část C v kapitole 9 popisuje výhradně optickou analýzu elektromechanických projevů u izolovaných dospělých kardiomyocytů. Jde konkrétně o varianty vícekanálového optického měření více funkčních parametrů uvedených v kapitole 5. Kapitola doplňuje tuto problematiku o návrh a ověření vhodných algoritmů pro tento typ měření. Kapitole obsahuje realizace současného měření s využitím k těmto účelům vyvinutých optických adaptérů pro promítání spektrálně oddělených obrazů na dvě kamery současně anebo zpětným promítáním spektrálně rozděleného obrazu na obrazový čip jedné kamery. V další části kapitoly jsou představeny vyvinuté metody detekce konců s úpravou obrazů fyzickým přestřehem pomocí posuvného tubusu v uvedeném optickém rozbočovači. Takováto úprava má za následek zvýšení kvality snímků, které pak mají přímý vliv na stabilitu a přesnost detekce konců. Další, fluorescenční metoda, měření kontrakce si klade za cíl snížit výpočetní nároky při obrazovém a signálovém zpracování a postarat se o zvýšení spolehlivosti při detekci. Uplatnění může najít v rychlých měřicích systémech. V poslední řadě je v kapitole provedena analýza záznamu kontrakce kardiomyocytu s využitím této metody a na tomto základě zhodnoceny změny získaných tvarových parametrů objektu kardiomyocytu úzce spojených s kontrakcí. Na této analýze je ověřena funkčnost a přesnost metody.

1 Elektromechanické projevy srdečních buněk

1.1 Srdeční buňky

Pro výzkum elektrofyziologie lidského srdce a srdečních funkcí je možné s úspěchem využít různých biologických modelů včetně zvířecích. To umožňuje provádět detailní analýzu dějů a jevů, které není možné neinvazivně zkoumat u živého organismu. Jedněmi z nejdůležitějších úrovní modelů jsou izolovaná zvířecí srdce, kultivovaná srdeční tkáň a volné (izolované) srdeční buňky. Původci buněk a orgánů se liší. V případě srdečních buněk to mohou být malí hlodavci (myši [1–3], potkani [4, 5]), nebo kuřata [6, 7]. Izolovaná srdce jsou nejčastěji získávána z větších hlodavců (morče, králík [8, 9]) nebo větších zvířat (psi [10], opice [11]). Primární kultury srdečních buněk jsou získávány postupnou izolací srdečních buněk ze zvířecího srdce a následnou kultivací za specifických laboratorních podmínek. Ke studiu elektrických a mechanických vlastností srdce se několik desetiletí využívají dospělé izolované kardiomyocyty a kultury neonatálních kardiomyocytů myši a potkana. Ty se mezi sebou liší svými vlastnostmi. Neonatální kardiomyocyty jsou velmi málo citlivé na vnější vlivy při jejich znovuzavedení do vápníkového média a jejich kultivace je rychlá. Buňky dokáží vykazovat elektromechanické projevy již za 20 a více hodin [12]. U dospělých kardiomyocytů jsou kultivace za určitých podmínek umožněny také [13, 14], avšak oproti neonatálním kardiomyocytům jejich projevy nastávají až později, v jednotkách týdnů (1-2 týdny a více [12]), kdy vykazují změny struktury i elektrických vlastností [7, 15]. Významný rozdíl je patrný při porovnání jejich struktury [16], elektrické a mechanické aktivity. U neonatálních kultivovaných kardiomyocytů probíhá samovolně, dospělé kardiomyocyty myši nebo potkana přitom vyžadují elektrickou aktivaci – stimulaci pomocí externího zdroje proudu sestávajícího z generátoru nejčastěji pravoúhlých střídavých impulsů s opačnou polaritou vedených do média přes stimulační elektrody [17]. Dospělé kardiomyocyty jsou často využívány jako čerstvě disociované funkční jednotky srdečního svalu. Obě skupiny poskytují přirozené vlastnosti srdečního svalu zvířecího modelu. V posledním desetiletí nastává rozsáhlý rozvoj velmi odlišné skupiny kardiomyocytů - tzv. indukovaných pluripotentních kmenových buněk (induced pluripotent stem cells, iPSC) [18, 19], které vynikají svými specifickými vlastnostmi a svým uplatněním. Uplatnění nachází zejména ve dvou oblastech: 1. při modelování nemocí a testování kardiotoxických látek a léčiv, 2. v regenerativní medicíně. Jejich vznik a využití vyjadřuje Obrázek 1.1 [19].

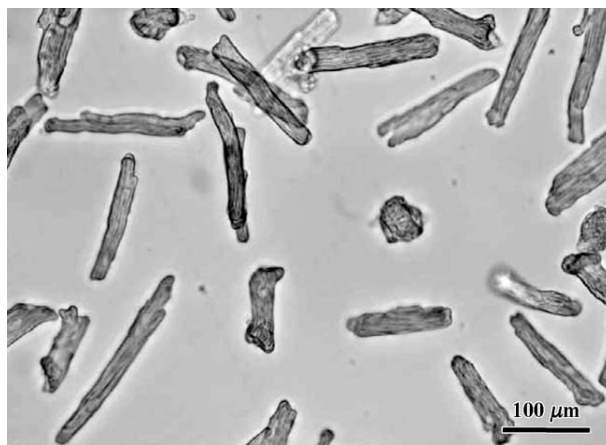


Obrázek 1.1 – Schéma znázorňující vznik, další procesy, metody měření a využití indukovaných pluripotentních kmenových buněk.

V základu se jedná o somatické lidské buňky, které prochází přeprogramováním a následnou diferenciací vzniká konkrétní typ buněk [18]. Příkladem zdroje somatických buněk mohou být často využívané kožní fibroblasty [20, 21]. V případě oblasti medicínského výzkumu srdečních onemocnění se jedná o somatické buňky pacientů s patofyziologickými buněčnými fenotypy geneticky dědičných nemocí, jako jsou arytmie anebo kardiomyopatie [19]. iPSC kardiomyocyty pak mohou být využity jako modely zahrnující tyto patologické vlastnosti. Současným výzkumem již bylo zjištěno, že diferencované kardiomyocyty jsou schopny vykazovat obdobné procesy zahrnuté ve vazbě excitace-kontrakce (změny transmembránového napětí, intracelulárního Ca^{2+} transientu a kontrakce) jako obecné kardiomyocyty [22].

Izolované srdeční buňky jsou samostatnými funkčními jednotkami, které lze využít jako vhodný model pro studium elektrických, mechanických a signalizačních projevů na nejnižší úrovni. Buňky jsou získávány enzymatickou izolací [12–14] z dospělého potkana o váze zhruba 250 g. Izolace jsou prováděny formou enzymatické disociace, přičemž explantovaná srdce jsou prokrvována kanylou přes aortu silným Tyrodovým roztokem (0,9 mmol/l) při konstantním průtoku (5 ml/min) zajištěným peristaltickou pumpou po dobu 30 vteřin. Srdce je tak vyživováno bezvápníkovým Tyrodovým roztokem obohaceným kolagenázou (kolagenáza typu II, Sigma-Aldrich, Germany) a proteázou (proteáza typu XIV, Sigma-Aldrich, Germany). Po oddělení srdce od kanyly jsou komory chirurgicky odděleny od zbytku srdce a následně rozděleny na drobné fragmenty. Získané fragmenty jsou zpět vloženy do Tyrodova roztoku. Sediment s velkým obsahem podélných buněk je vyfiltrován a uložen v koncentrovaném Tyrodově roztoku. Kardiomyocyty získané izolací jsou rozlišovány podle původu na kardiomyocyty z levé srdeční komory potkana a pravé srdeční komory potkana. Každá skupina se mírně liší svými vlastnostmi, jako jsou diastolická délka buňky anebo tepová perioda (TTP, čas od špičky ke špičce) [23]. Jednotlivé buňky také prakticky vykazují mírnou odlišnost ve vápníkové signalizaci a tvaru akčního napětí [24].

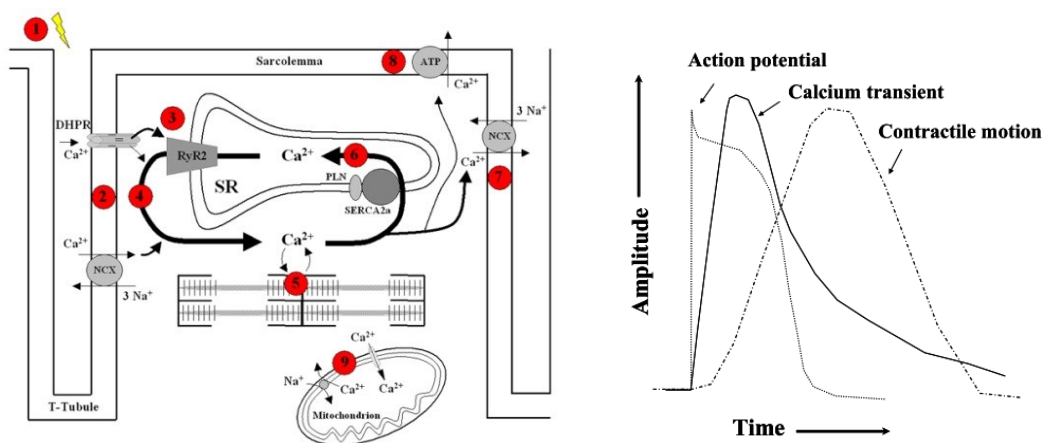
Dospělé izolované srdeční buňky potkana mají podlouhlý, přibližně válcovitý tvar. Na svých koncích se často větví. Buňky pracovního myokardu dosahují délky 100 až 150 μm a průměru 20 až 35 μm [25]. Buňku odděluje od vnějšího prostředí výrazná sarkolema, která má velký význam, mimo svou základní funkci, zejména v elektrofyziologii kardiomyocytu. Kontraktilní aparát vyplňuje velkou část buňky [25] a je formován do vzájemně se překrývajících úseků kontraktilních bílkovin - aktinu a myozinu. Myofibrily jsou členěny do jednotlivých příčných úseků, sarkomer, oddělených z-liniami. Z makroskopického hlediska se struktura jeví jako soustava střídajících se jemných světlých a tmavých proužků. Na membráně izolovaných kardiomyocytů jsou patrné také interkalární disky, jež tvořily pevné mechanické spoje mezi jednotlivými konci buněk [26]. Celkově je struktura kardiomyocytu velmi členitá a jednotlivé kardiomyocyty se liší tvarem i velikostí. V každém kardiomyocytu je uloženo jedno až dvě světlá, poměrně velká jádra.



Obrázek 1.2 – Izolované kardiomyocyty potkana různé velikosti a tvaru zobrazeny pomocí světelné mikroskopie. Obrázek obsahuje měřítko velikosti [27]

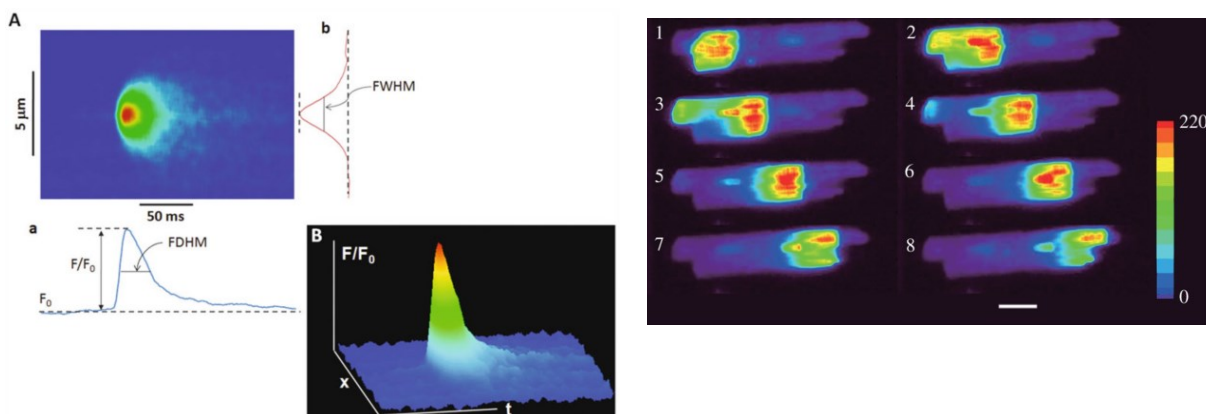
1.2 Srdeční aktivita a vazba excitace-kontrakce

Vazba, resp. spřažení či spojení, excitace-kontrakce zahrnuje řadu elektrofyziologických procesů, které se uplatňují u excitabilních svalových buněk. Tato skupina procesů je dobře známa a v dnešní době teoreticky detailně popsána v nespočetné řadě literatury a v současné době znalosti spadají do detailů molekulární úrovně procesů spojených s receptory a ději v rámci vazby excitace kontrakce [28, 29]. V kapitole jsou ozřejměny zejména jen základní děje, spojené s procesy napěťové membránové a molekulární vápníkové signalizace spojené s kontraktilním aparátem, které mají vztah k signálům změny akčního membránového napětí, vápníkových transientů a kontrakcemi srdečních buněk, kterými se práce v další fázi zabývá. Následující schéma (Obrázek 1.3) demonstruje základní princip a s ním spojené procesy v rámci excitace-kontrakce. Schéma zahrnuje vnější obal buňky, sarkolemu, se vnořenými úseky T-tubuly a integrovanými kanály či sodíko-vápníkovými pumpami (NCX). Schéma dále zahrnuje vnitřní struktury – sarkoplasmatické retikulum jako zásobárnu intracelulárního vápníku, mitochondrie, sensorické elementy a kontraktilní aparát. Kontraktilní aparát je zakreslen jen velmi symbolicky, v reálném případě je v intracelulárním prostředí zahrnut v mnohem širším měřítku. Detailněji je uvedeno na Obrázek 1.6.



Obrázek 1.3. Schéma znázorňující stěžejní procesy v rámci vazby excitace-kontrakce na úrovni buňky zahrnující molekulární signalizaci (vlevo) a výsledné signály charakterizující elektrickou, vápníkovou (signalizační) a mechanickou aktivitu srdeční buňky myokardu [29].

Za elementární události související se změnami koncentrace intracelulárního vápníku ve spojení excitace-kontrakce jsou považovány vápníkové záblesky (angl. „sparks“) [30]. Vápníkové záblesky lze přesněji definovat jako časově-prostorové změny koncentrace intracelulárního vápníku $[Ca^{2+}]_i$, které se vyskytují v intracelulárním prostředí kardiomyocytů [2]. Prakticky lze vápníkové záblesky pozorovat detailně metodami konfokální fluorescenční mikroskopie jako silné lokální změny $[Ca^{2+}]_i$, příklad analýzy vápníkového záblesku je uveden na Obrázek 1.4 vpravo. Vápníkové záblesky jsou spojeny s lokálním uvolněním velké koncentrace Ca^{2+} ze sarkoplasmatického retikula.



Obrázek 1.4 – Typický projev vápníkového záblesku zaznamenaný z komorového kardiomyocytu potkana s využitím vápníkového indikátoru Fluo-4 AM ([31]), vlevo, včetně ukázky analýzy charakteristik tohoto jevu (amplituda s určením FDHM a FWHM, a) a vygenerovaný plastický model získaného vápníkového záblesku. Napravo jsou snímky pořízené opět s využitím fluorescenční mikroskopie a vápníkového indikátoru v osmi krocích po 100 ms u izolované srdeční buňky s uvedeným měřítkem 20 μm , barevná škála označuje umělého zabarvení dle relativní koncentrace intracelulárního vápníku v prostorovém rozložení [32].

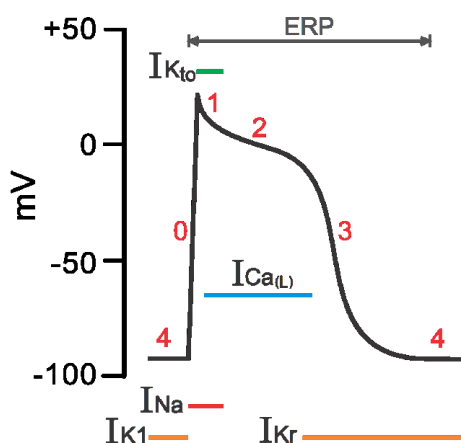
Pokročilé děje, vápníkové vlny (Obrázek 1.4, vpravo), jsou výsledkem spontánního uvolnění vápníkových iontů v intracelulárním prostředí a nastávají za určitých podmínek. Vyskytují se ve formě šíření změny $[Ca^{2+}]_i$ [33]. K šíření často dochází od bodů vzniku vápníkových záblesků podél celé buňky anebo k jejím koncům. Zjednodušeně lze vápníkové vlny definovat jako spontánní uvolnění Ca^{2+} ze sarkoplasmatického retikula, které není zapříčiněno změnou membránového akčního napětí [33]. Co se týče formy, vápníkové vlny jsou prostorově rozsáhlejší než vápníkové záblesky a jsou charakteristické svou prostorovou vysokou uniformitou.

Zatímco vápníkové vlny vznikají spontánně bez obvyklé elektrické aktivity srdeční buňky, vápníkové transienty vznikají za normálními podmínkami. Vápníkové transienty jsou na rozdíl od určité skupiny vápníkových záblesků a vápníkových vln výsledkem více buněčných procesů, nikoli pouze výsledkem uvolnění vápníkových iontů ze sarkoplasmatického retikula [2]. Obecně lze vápníkové transienty považovat za průměrované změny $[Ca^{2+}]_i$ souhrnu jednotlivých lokálních změn $[Ca^{2+}]_i$. Vápníkové záblesky jsou charakterizovány místem vzniku a amplitudou [31], vápníkové vlny jsou charakterizovány jako úroveň koncentrace vápníkových iontů ve vztahu k prostorovému rozložení v čase. Vápníkové transienty jsou získány jako celková koncentrace vápníkových iontů v intracelulárním prostředí.

1.3 Signály vazby excitace-kontrakce

Na obrázku Obrázek 1.4 vpravo jsou zobrazeny signály spojené se stěžejními procesy v rámci vazby excitace-kontrakce na úrovni srdeční buňky myokardu charakterizující elektrickou, vápníkovou (signalizační) a mechanickou aktivitu srdeční buňky. Signály vynikají vzájemnou časovou návazností a vzájemnou provázaností.

Celý proces excitace-kontrakce je započat elektrickou aktivitou, která se šíří svalovinou myokardu. V běžném případě se buňky srdečního myokardu nachází v klidu. Na jejich membráně se uplatňuje klidové membránové napětí, které se může lišit a odpovídá hodnotám zhruba -80 mV [34, 35]. Ke změně dochází v případě překročení prahového membránového napětí, kdy nastává velmi rychlá depolarizace (Obrázek 1.5, fáze 0). Fáze depolarizace trvá pouze několik milisekund a je charakteristická prudkým nárůstem hodnoty membránového napětí až do zhruba jedné desítky milivoltů. V následující fázi akčního napětí, repolarizaci, se membránové napětí navrácí zpět do původních hodnot. Repolarizace začíná krátkým rychlým poklesem napětí (Obrázek 1.5, fáze 1). Vápníkové ionty depolarizaci zpožďují a nastává fáze plató akčního napětí (Obrázek 1.5, fáze 2). Proud vápníkových iontů směrem dovnitř buňky nastává přes vápníkové kanály typu L („long-lasting“) integrované v membráně buňky. Následně je vlivem nárůstu draslíkového proudu impuls akčního napětí ukončen. Případně, při zakončení impulsu akčního napětí může dojít ke krátké hyperpolarizaci, kdy hodnota membránového napětí dočasně poklesne až pod úroveň klidového napětí. Akční napětí se ke kardiomyocytům myokardu dostává ze sousedních buněk pomocí vodivých spojení mezi myocyty, přes interkalární disky. Příchozí akční napětí se u kardiomyocytu šíří podél vnější membrány a také příčně tubulárním systémem směrem dovnitř buňky [36]. Pro vybuzení akčního napětí je kladná nadprahová úroveň napěťového stimulu.

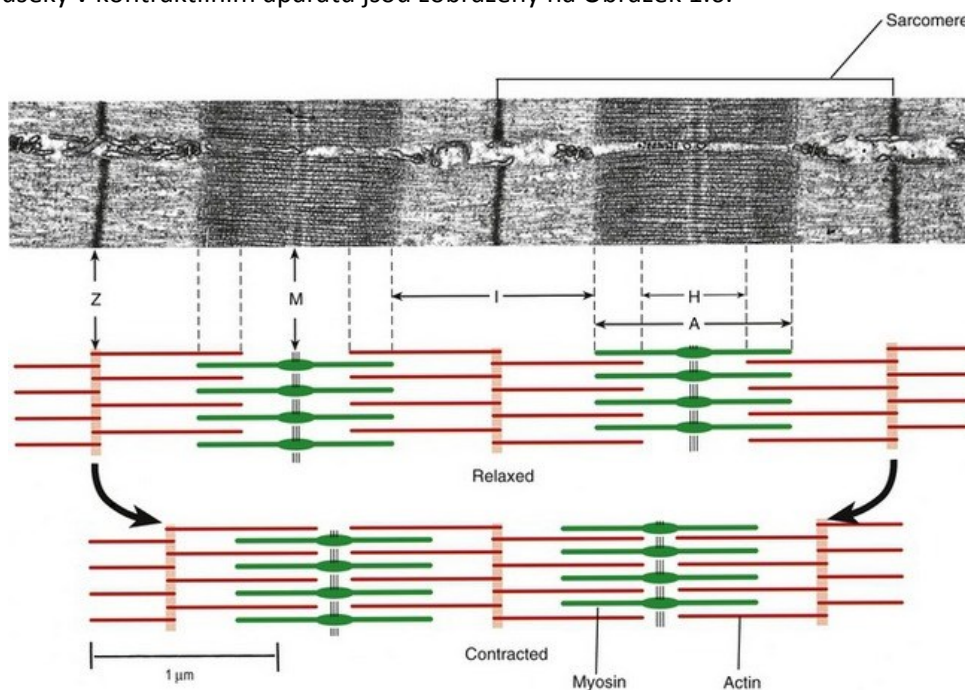


Obrázek 1.5 – Akční napětí s číslovanými fázemi (4 – klidová fáze, 0 – depolarizace, 1 – rychlá Repolarizace, 2 – fáze plató, 3 repolarizace). Pozičně jsou vyznačeny jednotlivé proudové složky, které se daných fází akčního napětí účastní. ERP vyznačuje efektivní refrakterní fázi, ve které nemůže vzniknout další akční napětí. [37]

K otevření Ca^{2+} kanálů dochází ve fázi plató [38] aktivací přes dihydropyridinové receptory (dihydropyridine receptor, DHPR, Obrázek 1.3) a vápníkové ionty následně proudí z extracelulárního prostředí směrem dovnitř dle svého koncentračního gradientu [39]. Vzestup $[\text{Ca}^{2+}]_i$ působí na RyR (ryanodinové) receptory v sarkoplasmatickém retikulu, čímž dochází k uvolnění velkého množství vápníkových iontů do cytosolu. Cyklus je znám jako regenerativní, vápníkovými ionty vyvolané uvolnění zásob vápníku (calcium-induced calcium release, CICR) [40, 41]. Cytosolová koncentrace vápníku se tak zvýší o zhruba dva řády a je na dostatečné úrovni pro vyvolání kontrakce. Proces vyplavení je velice rychlý a na konci fáze plató vápníkový proud ustává a dochází k uzavírání vápníkových kanálů přítomných na povrchu sarkoplasmatického retikula (SR). Ke kontrakci dochází za účasti energie ve formě adenosin trifosfátu (ATP), který se naváže na myozin a štěpí se. Aktivace kontraktálního aparátu je v této fázi závislá na přítomnosti vápníkových iontů, které se po příchodu ke kontraktálním elementům naváží na troponin a odblokuje tím vazebná místa na aktinových filamentech. Výsledně dochází k uvolnění energie a postupnému ohýbání navázané myozinové hlavičky – dochází k posunu

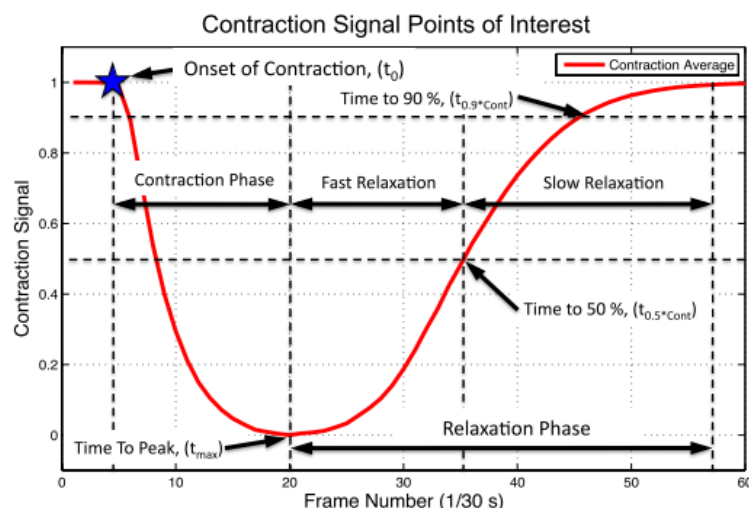
aktinových vláken po myozinových. Vazba aktinu a myozinu je poté oslabena navázáním nové molekuly ATP na myozin. Na konci fáze jsou vápníkové kanály v SR uzavírány a aktivitu projevuje vápníková pumpa (s využitím energie štěpením ATP) v SR, která vápníkové ionty přečerpává zpět. Další část vápníkových iontů je z buňky přečerpávána prostřednictvím sekundárně aktivního transportu – Ca-Na pumpy. Výsledkem je pokles $[Ca^{2+}]_i$ a Ca^{2+} iontů z vazby na troponinu jsou uvolňovány. Aktivní vazebná místa jsou zablokována. Po této fázi dochází k opětovnému opakování celého cyklu.

Z pohledu měření kontrakce je důležitý kontraktilní aparát a jeho struktura, s tím související morfologie měřených kardiomyocytů. Řada metod se orientuje na zobrazování a měření změn v interní struktuře kardiomyocytů vytvořené kontraktilním aparátem. Mikroskopický snímek sarkomer a odpovídající úseky v kontraktilním aparátu jsou zobrazeny na Obrázek 1.6.



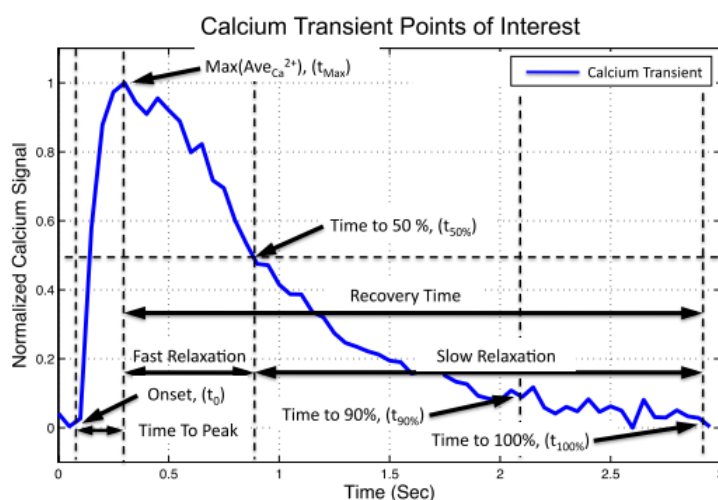
Obrázek 1.6. – Schéma popisuje dvě varianty pozice tenkých a tlustých vláken – stav relaxace a stav plné kontrakce – s vyznačením jednotlivým pásem a odpovídajícím mikroskopickým snímkem (kosterního svalu ve vysokém detailu [42]. Z – z-linie se zakotvením tenkých filament, A-proužek (je anizotropní v polarizovaném světle), I – světlý úsek tvořený aktinovými filamenti (je izotropní v polarizovaném světle)

Signál kontrakce sestává ze dvou hlavních fází – fáze kontrakce a fáze relaxace. Ve fázi kontrakce dochází k postupnému nárůstu kontrakční síly a ve fázi relaxace k dlouhému uvolnění. Fázi relaxace lze rozdělit na rychlou relaxaci a pomalou relaxaci, kdy dochází nejdříve k rychlému a následně velmi pozvolnému uvolnění, k relaxaci. Jeden impuls kontrakce, jednotlivé fáze a podstatné body důležité zejména z hlediska pozice signálu a pro účely rozměření signálu jsou uvedeny na Obrázek 1.7. Při rozměřování jsou tedy podstatné časové parametry popisující rychlost fáze stahu a uvolnění a parametry odpovídající síle kontrakce.



Obrázek 1.7 – Průměrný signál kontrakce z [43] s detekovanými body t_0 , t_{max} a obdobně v 50 % amplitudy signálu a v 90 % amplitudy signálu, ze kterých probíhá výpočet fází uvedených v grafu: kontrakční fáze (Contraction Phase), relaxační fáze (Relaxation Phase), tu lze rozdělit na rychlou relaxační fázi (Fast Relaxation) a pomalou relaxační fázi (Slow Relaxation).

U signálu vápníkového transientu je charakteristický prudký nárůst, který je dán rychlým vyplavením vápníkových iontů ze zásobárny (SR). Po dosažení maxima následuje fáze odpovídající výše uvedenému procesu postupného vyčerpání vápníkových iontů z cytosolu a relaxaci – jedná se o pozvolný pokles signálu na původní úroveň před kontrakcí. Při rozměření signálu je opět zajímavá amplituda odpovídající relativní koncentraci vápníkových iontů v intracelulárním prostředí. Podstatné parametry pro hodnocení jsou tedy čas pro dosažení maxima a tato hodnota obsažená v maximu, následně pak celková doba relaxace, která odpovídá poklesu signálu na počáteční hodnotu. Celková doba relaxace může být rozdělena na rychlou a pomalou relaxaci. Signál s vyznačenými fázemi je zobrazen na Obrázek 1.8.



Obrázek 1.8 - Průměrný signál vápníkových transientů z [43] s detekovanými body t_0 (Onset, počáteční bod signálu), t_{Max} a obdobně v 90 % amplitudy signálu a v 100 % poklesu amplitudy signálu, ze kterých probíhá výpočet fází uvedených v grafu: fázi nárůstu signálu do maxima (Time to Peak) a fázi návratu do původní koncentrace vápníkových iontů v cytosolu (Recovery Time) rozdělenou na rychlou (Fast Relaxation) a pomalou relaxační fázi (Slow Relaxation).

Jednotlivé funkční parametry vyznačené v obou grafech, jejich rozložení a úseky či body určené k detekci jsou blíže popsány v kapitole 6.2.

2 Metody měření elektromechanických projevů srdečních buněk

Metody měření srdečních buněk lze rozdělit na ryze optické (s využitím světelné, fluorescenční anebo holografické mikroskopie) anebo metody kontaktní (mikroskopie atomárních sil (AFM), metody založené na uchycení konců a měření síly stahu k tomu určeným zařízením) anebo semi-kontaktní metody založené na elektrickém principu (impedanční metoda). Tato práce se orientuje zejména na optické metody. Ostatní metody jsou však také diskutovány, neboť např. metoda AFM je hojně využívána v praktické práci jako referenční metoda a ostatní metody jsou kombinovány s optickým měřením dalších elektrofyzikálních parametrů srdečních buněk.

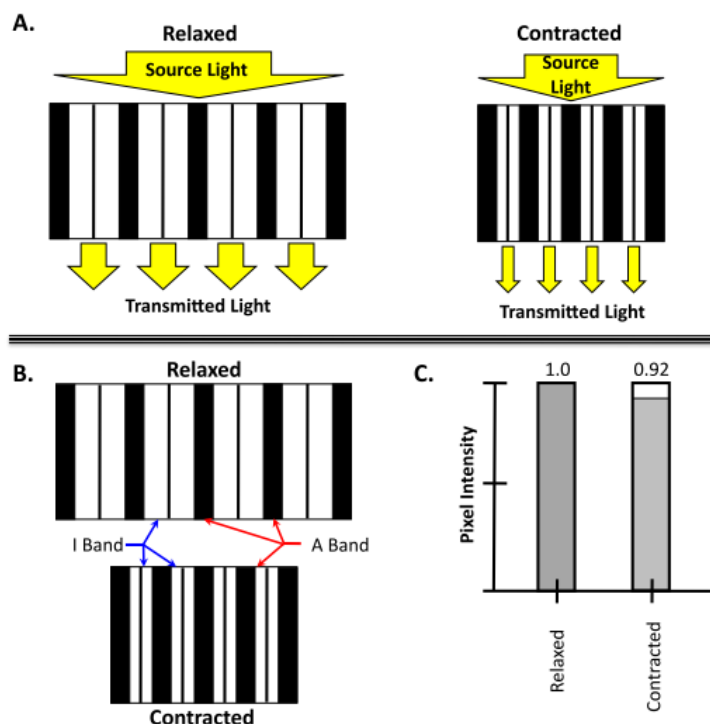
2.1 Optické metody měření kontrakce

Optické metody měření kontrakce historicky procházely postupným vývojem, který má přímou souvislost s pokrokem v oblasti optické mikroskopie a zejména s vývojem analogové a později digitální snímací technologie, a dále s vývojem optických a obrazových senzorů. Jelikož je ve většině postupů získána a hodnocena časová posloupnost mikroskopických obrazů, tzv. video-sekvence, kontrahující se buňky, skupiny buněk nebo tkáně, jednotlivé metody jsou závislé na kvalitě a obsahu získaného obrazu. Kvalita obrazu souvisí s potřebou současného snímání s velkým časovým a prostorovým rozlišením, přitom však s nízkou úrovní šumu snímače a celého zobrazovacího řetězce. Dřívější metody publikované v 70. – 90. letech využívaly pro snímání v té době dostupné řádkové nebo maticové obrazové snímače často založené na fotodiodových polích anebo televizních (TV) kamerách. Autoři v [44] využívají k detekci konců buňky fotodiodové pole napojené na hardwarový systém zahrnující komparátor a čítač, který po digitalizaci výstupu vypočte délku buňky. Při využití analogové TV kamery [45] již bylo možné získat obraz o dostatečném rozlišení pro rozpoznání detailu objektu kardiomyocytu. Současně s využitím řádkového skenování bylo možné se zaměřit na úsek sledovaného kardiomyocytu a zachytit jeho hranice s vysokým prostorovým rozlišením. Nezbytnou součástí měřicího systému [44] je digitalizační jednotka pro digitalizaci a ukládání nasnímaných dat získaných z fotodiodového pole. Tyto a obdobné metody s limitovaným zobrazovacím systémem a s absencí výkonné výpočetní jednotky dosahovaly značná omezení spojená s malým prostorovým a časovým rozlišením, nutnosti využití přídavného hardwarového systému, složitým nastavením a kalibrací. Bez těchto prvků by detekce selhávala. Z těchto důvodů se dříve publikované metody omezují na detekci pouze některých jevů, např. na detekci pohybu malého úseku hranice buňky [44, 45] anebo změny vzdálenosti sarkomer [46, 47]. V současné době se již uplatňují velmi rychlé digitální kamery s relativně vysokým prostorovým rozlišením a nízkou úrovní šumu. S výhodou získání kvalitních snímků se pak další vývoj logicky zaměřuje na aplikaci pokročilejších postupů obrazového a signálového zpracování a hodnocení získaných dat. Sledovaný objekt a jeho časově-prostorové změny lze hodnotit komplexněji a ve větším detailu.

U kardiomyocytů dospělého potkana, které lze považovat za elementární kontraktilní jednotky, se kontrakce projevuje změnou vzdáleností konců a vzájemně dochází k mírné expanzi membrány do stran. Avšak lze také sledovat změnu konformace vnitřní struktury. Různé metody se tak zaměřují na detekci hranice srdečních buněk anebo na detekci interních změn struktury, pokud jsou tyto projevy u daného typu srdečních buněk patrné, a z těchto změn kvantifikují sílu kontrakce.

První skupina metod využívá možnosti mikroskopického zobrazení až na úroveň kontraktilního systému – na úroveň sarkomer. Sarkomery způsobují viditelné proužkování na povrchu buňky, které je zapříčiněno střídáním tenkých a tlustých filament v kardiomyocytu. V mikroskopickém obraze se vyznačuje střídáním tmavých a světlých proužků. Viz detailní zobrazení (mikroskopický snímek) a porovnání s kontraktilním aparátem na Obrázek 1.6 v předešlé kapitole. U mikroskopie ve světlém poli

Lze uvažovat proužkování kardiomyocytu jako částečně propustný plochý objekt, kdy tlusté filaments propouští mnohem menší množství světla než filaments tenké. V idealizovaném případě lze tmavé proužky považovat za nepropustné průchozímu světlu, naopak světlé proužky za dokonale propustné průchozímu světlu. Ve výsledku lze vytvořit idealizované schéma proužkování kardiomyocytu se střídajícími se černými a bílými proužky, jak je uvedeno na Obrázek 2.1.

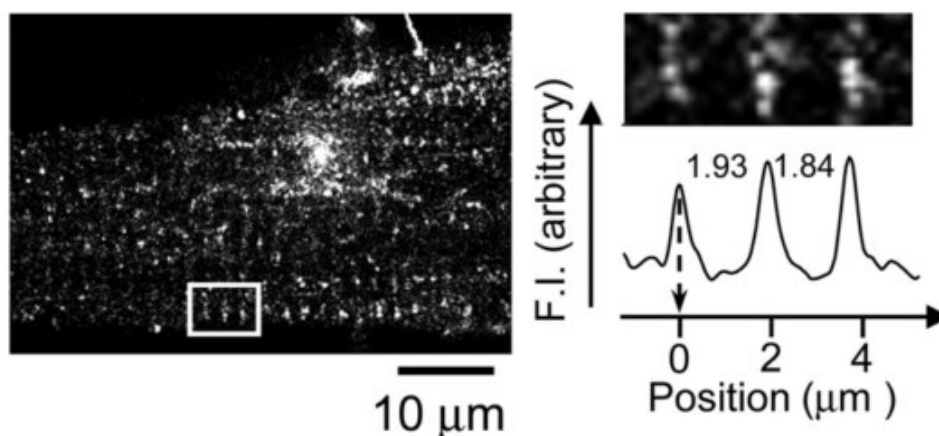


Obrázek 2.1. Schéma vyjadřující model proužkování způsobeného úseky sarkomer uvnitř kardiomyocytu s demonstrací průchodu světla v případě uvolnění a kontrakce (A). V části (B) jsou vyznačeny jednotlivé typy pásem filament. Výsledná suma pixelů intenzity způsobuje průměrnou změnu vzdálenosti sarkomer o 8 % (C). [43]

Ve schématu jsou zahrnuty také Z-disky - uchycení filament, jako tenké příčné linie. Jakmile dojde ke kontrakci kardiomyocytu, vlivem zasouvání tenkých filament do tlustých dojde k zúžení opticky propustného prostoru, viz Obrázek 2.1 A a B. Jednoduchou analýzou lze vypočítat intenzitu pixelů v oblasti zájmu obrazu odpovídající úseku s pravidelným proužkováním. Na Obrázek 2.1 C je zobrazen vypočtený rozdíl hodnot získaných jako sumy pixelů v relaxovaném a kontraktálním stavu odpovídající zhruba 8 % [43]. V uvedeném případě je použita přímá projekce sarkomer s využitím optiky mikroskopu na obrazový senzor. Mnohem častěji se pro prosvětlení proužkové struktury kardiomyocytu účelně využívá laser, vzhledem k jeho vlastnostem. V tomto případě není hodnocena prostorová vzdálenost proužků v oblasti zájmu, ale vzniklý difrakční obrazec [46–51]. Kardiomyocyt se chová jako nehomogenní trojrozměrný difrakční prvek. Na vzniku difrakčního obrazce se podílí přítomnost A a I pásem a interference rozptýleného světla na těchto strukturách [52]. Délka sarkomer je vyhodnocena z hodnoty maxima z prvního řádu vzniklého difrakčního obrazce [52]. V daném případě je účelně využívána také 2-D Fourierova spektrální analýza [53].

Ačkoli se základní princip metody měření délky sarkomer jeví jako poměrně snadný, úspěšnost metody je závislá na řadě podmínek. V první řadě je nutné zajistit dostatečné zvětšení až na rozeznatelnou úroveň proužkování a snímací zařízení musí vykazovat požadované parametry. Je potřeba vzít v úvahu typickou velikost sarkomery 1,8 μm [54]. Obrazový senzor musí vynikat dostatečně malým rozměrem pixelů a odpovídajícím velkým počtem pixelů v zorném poli (field-of-view

, FOV). Přitom však musí být šum minimální, neboť ten naopak roste se zmenšováním rozměrů pixelů na snímači. Snímač musí být uzpůsoben tak, aby bylo možné s dostatečným rozlišením zachytit změnu velikosti sarkomer. K těmto účelům jsou v současné době vhodné vědecké sCMOS a EMCCD chlazené kamery navrhované s ohledem na minimalizaci šumu a kombinaci zmíněných parametrů. Kardiomyocyt také vykazuje výraznou celoplošnou nehomogenitu a řazení sarkomer je v mnoha místech kardiomyocytu nepravidelné. Značný vliv na kvalitu hodnocených dat a případnou chybovost metod zaměřených na analýzu interní struktury mohou mít kvalita osvětlení a ostření při sledování měřeného kardiomyocytu, související přítomnost nežádoucích částic v oblasti buňky [54] nebo vliv sarkolemy a jejich nerovností a jiných částí buňky ovlivňující průchod světla. Správné hodnocení kontrakce kardiomyocytu z délky sarkomer je tedy přímo závislé na vybrané oblasti v kombinaci se správným zobrazením proužkování. V běžném případě může být popsána metoda realizovaná s využitím optické mikroskopie ve světlém poli omezena malou optickou prostorovou rozlišitelností sarkomer a zejména nedostatečným kontrastem mezi světlými a tmavými úseky. Snahou některých autorů je proto zvýšit kontrast využitím fluorescenční mikroskopie. V publikaci [55] jsou k tomuto účelu využívány kvantové tečky, které se specificky vážou ve struktuře kontraktilního aparátu. Princip je zobrazen na následujícím obrázku Obrázek 2.2. Pozici sarkomer lze ve fluorescenčním snímku přesněji a zejména ve větším detailu detekovat ve srovnání se zobrazením mikroskopii ve světlém poli.



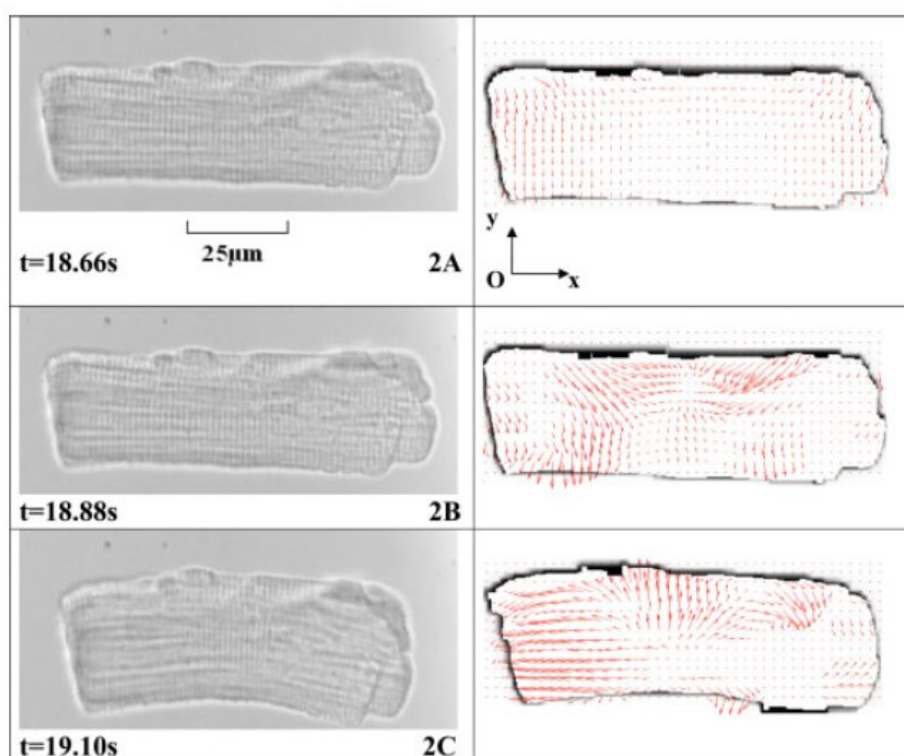
Obrázek 2.2. Fluorescenční snímek kardiomyocytu značeného směsí kvantových teček anti-alfa-aktininu antibody-QD a FuGENE HD [55]. V obraze je možné v oblasti zájmu (vpravo nahoře) detekovat velmi úzké úseky značené kvantovými tečkami a hodnotit jejich pozici.

V případě [56] se využívá fluorescenčního značení specifických komponent tenké filamenty. S využitím této metody pracující s fluorescenční mikroskopií a CCD kamerou je možné detekovat kontraktilní struktury ještě v mnohem vyšším detailu a s mnohem rovnoměrnějším zvýrazněním struktur než je tomu u [55].

Vývoj metod zaměřených na hodnocení interních změn struktury kardiomyocytu při kontrakci pokračuje i v posledních letech [54, 57]. Autoři se snaží o vývoj sofistikovanějšího algoritmu pro hodnocení kontraktilní změny vnitřních struktur ve větším měřítku a často se odkazují na potřebu eliminace nežádoucích vlastností, které s sebou nesou postupy s využitím primitivnějších algoritmů. Autoři ve své publikaci [54] představují pokročilý algoritmus hodnocení délky sarkomer z vybrané středové oblasti buňky s využitím konvenční metody založené na autokorelační funkci (Autocorrelation Function, ACF) o spektrální analýzu s využitím rychlé Fourierovy transformace (Fast Fourier Transform, FFT) za účelem měření podobnosti mezi sousedními snímky, která bere v potaz prostorovou závislost sousedních pixelů v oblasti zájmu při postupném pohybu během kontrakce. Ve výsledcích autoři

deklarují velmi dobrou výpočetní efektivitu a vysokou přesnost měření. Dle autorů [54] vyvinutý algoritmus eliminuje přítomnost uhlíkových vláken a jádra v oblasti zájmu, nerovnoměrnost pozadí, avšak mírné problémy způsobují nerovnoměrné orientace sarkomer ve sledované oblasti.

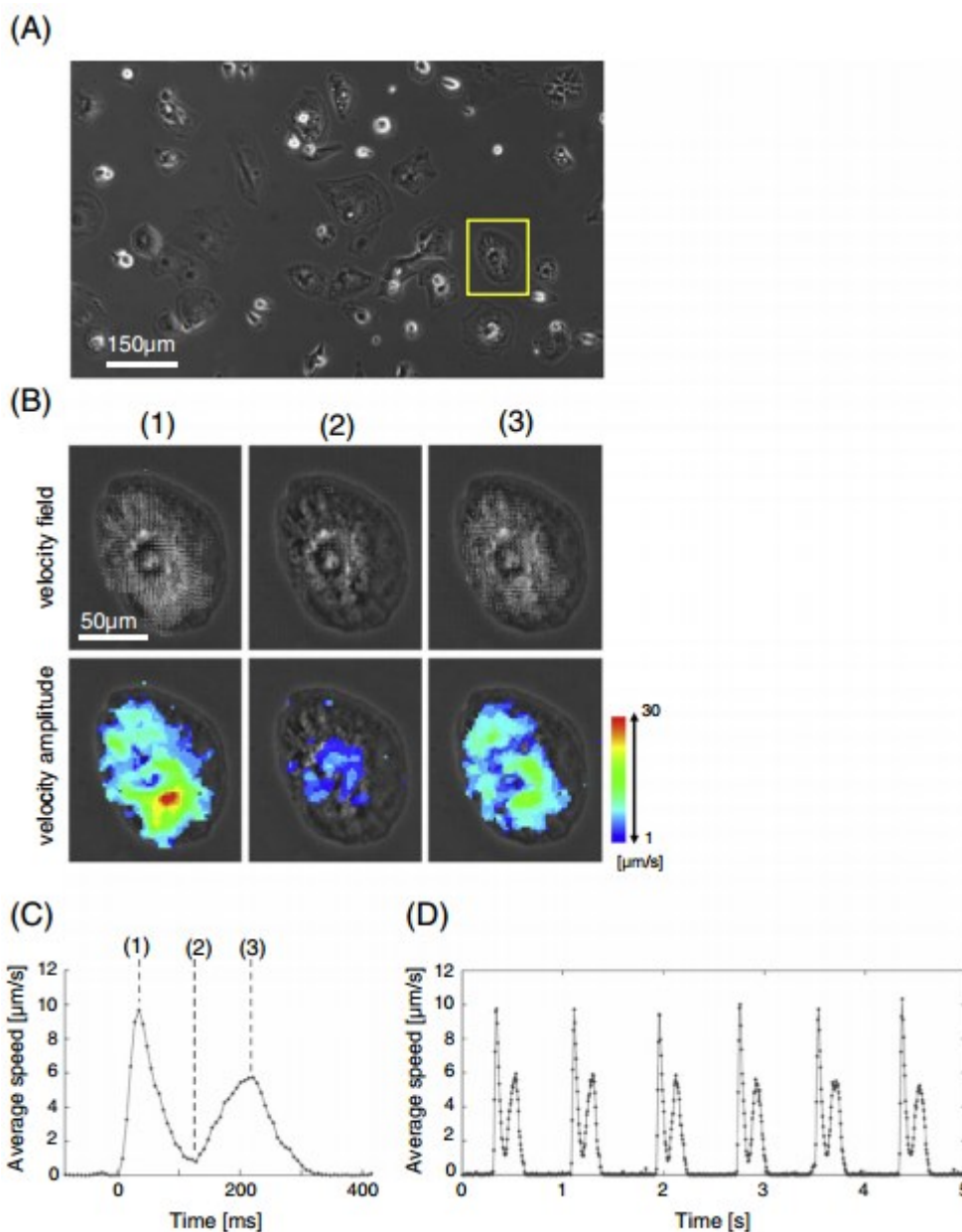
Jako perspektivní se jeví postup použitý v [57], který využívá obdobného principu jako detekce prostorových změn pixelů v časovém měřítku obdobně jako [54]. K analýze prostorových deformací mezi jednotlivými časovými sekvencemi snímků byla autory vyvinuta dvourozměrná obrazová korelační analýza, která je aplikována na celý obraz kardiomyocytu. U metody je využita pro zvýraznění obrazu optická mikroskopie s fázovým kontrastem. Metoda bere výhodně v potaz také celkový tvar kardiomyocytu. Dokáže tak reagovat i na prostorové deformace obrazu kardiomyocytu při kontrakci i v případech, kdy dochází ke stahům jeho konců mimo osu. Tzn., pokud dochází k prohnutí kardiomyocytu či pohybu jen jeho části, což může být způsobeno uchycením části kardiomyocytu na dně (na miskou). Příklad provedené vektorové analýzy pohybu pixelů obrazu kardiomyocytu je znázorněn na Obrázek 2.3.



Obrázek 2.3. Příklad snímku kardiomyocytu ve třech různých časových intervalech v případě postupné kontrakce (2A-C) a odpovídající provedená vektorová analýza napravo.

Jak je v [57] taktéž ověřeno, metodu lze úspěšně aplikovat také na kultivované kardiomyocyty. Ty jsou vzhledem k jejich prostorovému uspořádání, absenci pravidelného proužkování a malému kontrastu hranice buňky pro optickou analýzu zvláště náročné. Obdobné uplatnění nachází metoda vektorové analýzy pohybu pixelů v případě měření kontrakce u kardiomyocytů odvozených z pluripotentních kmenových buněk (Induced Pluripotent Stem Cell - Derived Cardiomyocytes, iPSC-CM), kde je ve velké většině případů vzhledem k náročnosti využití optických metod využívána metoda s využitím AFM (Obrázek 2.4). Výsledný signál získaný vektorovou analýzou pohybu pixelů v sekvenci snímků vykazuje odlišnost od obvyklého charakteru signálu kontrakce (Obrázek 1.7), důvodem je měření rychlosti pohybu pixelů v oblasti zájmu. Obsahuje v jednom kontrakčním cyklu celkem dvě signálové špičky,

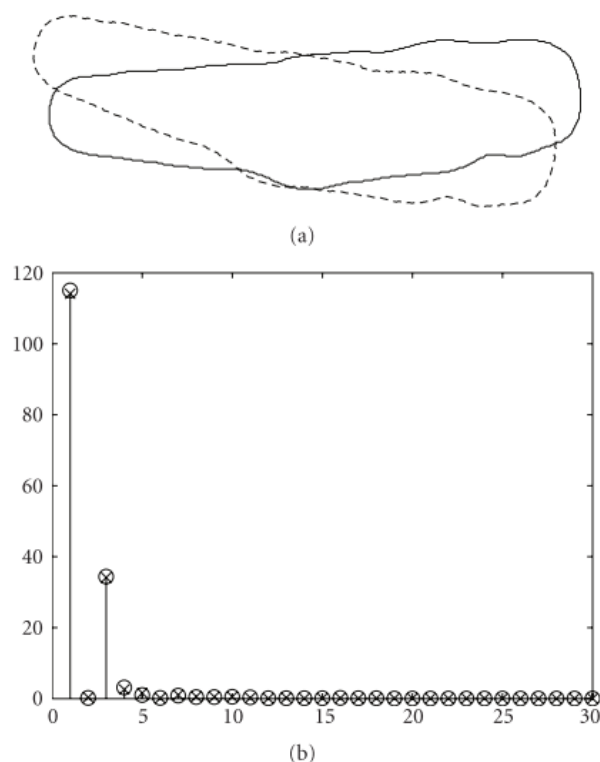
první charakterizuje fázi kontrakce, druhá fázi relaxace. Přibližuje se tak charakteru silového signálu AFM se dvěma odpovídajícími špičkami, avšak s opačnou polaritou.



Obrázek 2.4 – A) Ukázka jednoho snímku využitého pro obrazovou analýzu pořízeného světelnou mikroskopií s využitím fázového kontrastu a ukázkou výběru oblasti zájmu – výběru objektu, na kterém probíhá následná analýza. B) Tři snímky v ROI v odlišných časových okamžicích, v dolní části pak přiřazená vrstva s umělým obarvením dle zjištěné rychlosti pohybu pixelů v μm odpovídající vhodně vybraným pozicím C) v extrahovaném signálu. D) extrahovaný signál kontrakce a relaxace udávaný v průměrné rychlosti pixelů za sekundu v širším časovém úseku s šesti cykly. Zdroj [58]

Druhá skupina vyvinutých metod se orientuje na detekci změn tvaru kardiomyocytu. Změna vzdálenosti konců odpovídající zkracování kardiomyocytu při kontrakci je přímo úměrná celkovému průměru délky sarkomer v podélném směru a je tak nejčastěji detekovaným parametrem u celé buňky. Ostatní postupy zaměřené na hodnocení kontrakce z buňky jako objektu se orientují na hodnocení celkové změny tvaru buňky různými způsoby. V případě [59] autoři využívají k hodnocení tvaru Fourierových deskriptorů, které se využívají v různých oblastech obrazového zpracování k popisu tvarů

objektů. Přesněji, Fourierovými deskriptory je hodnocena získaná kontura kardiomyocytu v každém snímku a signál kontrakce hodnocen ze sady získaných 30 Fourierových deskriptorů, které popisují mimo tvarové změny také rotaci, translaci a invariaci počátečního bodu objektu (resp. jeho kontury), viz příklad na Obrázek 2.5.



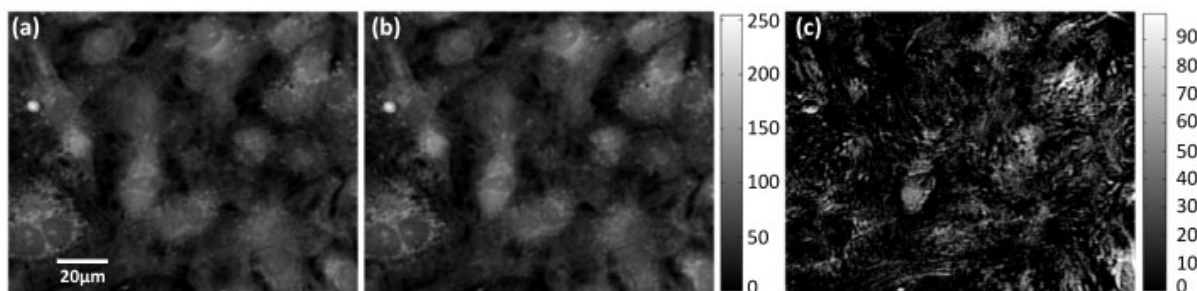
Obrázek 2.5 – a) Detekovaná kontura kardiomyocytu při změna tvaru (délky a natočení). b) Odpovídající sada Fourierových deskriptorů citlivá na změnu tvaru, rotaci, translaci a invariaci počátečního bodu. Převzato z [59].

Metody založené na hodnocení vzdálenosti konců kardiomyocytů jsou postaveny na principu co nejpresnější detekce bodů, které odpovídají zakončení kardiomyocytů. V tomto případě se často využívá vlastnosti řádkového skenování liniového nebo maticového snímáče [43] a prvotní podmínkou je tak zajistit natočení kardiomyocytu co nejpresněji do horizontálního směru jeho podélnou osou. První pokusy probíhaly s využitím řádkového fotodiodového pole jako detektoru [52]. Snahou bylo využít rozptýlené světlo procházející přes objekt kardiomyocytu a zachytit jej na řádkovém detektoru. Podstatnou nevýhodou se ukázala pouze možnost měření relativní změny vzdálenosti konců vzhledem k různému tvaru a rozměru kardiomyocytu a také v závislosti na intenzitě průchozího světla [52]. Pokročilé možnosti ukazuje varianta [60], kde bylo použito 256 prvkové řádkové fotodiodové pole. Metody zaměřené na detekci konců byly používány mnohem dříve než metody spadající do kategorie hodnotící tvar buňky. Důvod je zřejmý, v tomto případě není nutný obrazový senzor. Jako dostačující se uplatňuje řádkový senzor za podmínky správného natočení měřeného objektu – natočením podélné osy kardiomyocytu ve směru detekčního prvku [45]. Detekční metody jsou často obdobné metodám zaměřeným na měření délky sarkomer, neboť jsou principy převedeny na celý úsek celé buňky místo malé vybrané oblasti zájmu. Používány jsou tak i metody laserové difrakce. Metoda detekce konců je výhodná z hlediska detekční rychlosti. Systémy pro detekci konců často pracují v reálném čase, na principu hranového detektoru. Výhodný je vysoký kontrast mezi málo opticky propustnou sarkolemou kardiomyocytu a opticky propustným pozadím a možnosti rychlého a přesného nalezení dvou

přechodových bodů. Svou jednoduchostí a rychlostí metoda nachází uplatnění v současném měření kontrakce spolu s dalším optickým měřením (zejména v případě měření vápníkových transientů) [61, 62]. Metoda detekce konců s sebou přináší výhody ve spolehlivosti a přesnosti detekce ve srovnání s metodami založenými na detekci celé kontury kardiomyocytu v případě využití obrazového senzoru s dostatečným rozlišením a obrazovou analýzou schopnou zajistit potřebné korekce [62].

2.2 Holografická mikroskopie

Mezi ostatní optické metody měření, alternativně k optické mikroskopii, patří metoda měření kontrakce využívající digitální holografické mikroskopie (Digital Holographic Microscopy, DHM) s kvantitativním fázovým zobrazováním. Metoda využívá získání výškového profilu vzorku a jeho hodnocení. Dá se říci, že jde o optickou obdobu principu využívaného AFM (v tomto případě s pomocí kontaktního hrotu a jeho pohybu), kdy je detekována změna pozice hraniční oblasti jednotlivých kardiomyocytů nebo shluků buněk vertikálně z horní části. S využitím principu DHM je získána sada snímků získaných rozdílem mezi referenční optickou cestou u DHM a optickou cestou vedenou přes sledovaný objekt (angl. optical path difference, OPD). Příklad získaných dvou snímků z maxima kontrakce a klidové fáze je uveden na Obrázek 2.6. V následujících krocích algoritmu je prostým prahováním odstraněno pozadí a výpočtem hodnot pixelů zbylé části jsou extrahovány signály kontrakce. Metoda vyžaduje náročné přístrojové vybavení a nastavení a přitom dosahuje velmi malé časové rozlišovací schopnosti a malé rozlišení v amplitudě extrahovaných signálů. Autoři [63] však prokazují, že i ze získaných signálů je možné s relativně dostatečnou přesností dosáhnout detailní analýzy signálů se zaměřením na jejich rozměření a hodnocení získaných parametrů (z rozměřených úseků).

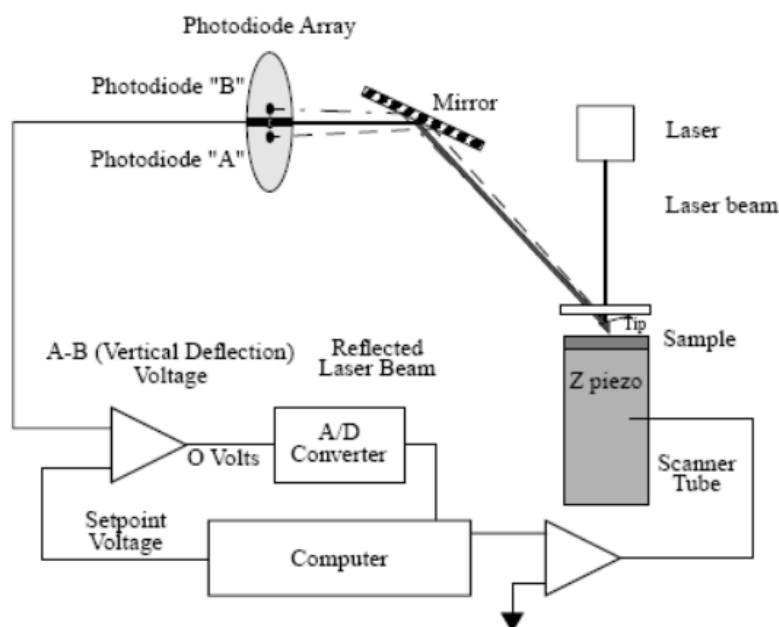


Obrázek 2.6 – Ukázka snímků OPD získaných v maximu kontrakce (a) a klidové fázi (b). Na c) je znázorněn rozdíl po provedení subtrakce snímků. Zdroj [63]

2.3 Mikroskopie atomárních sil

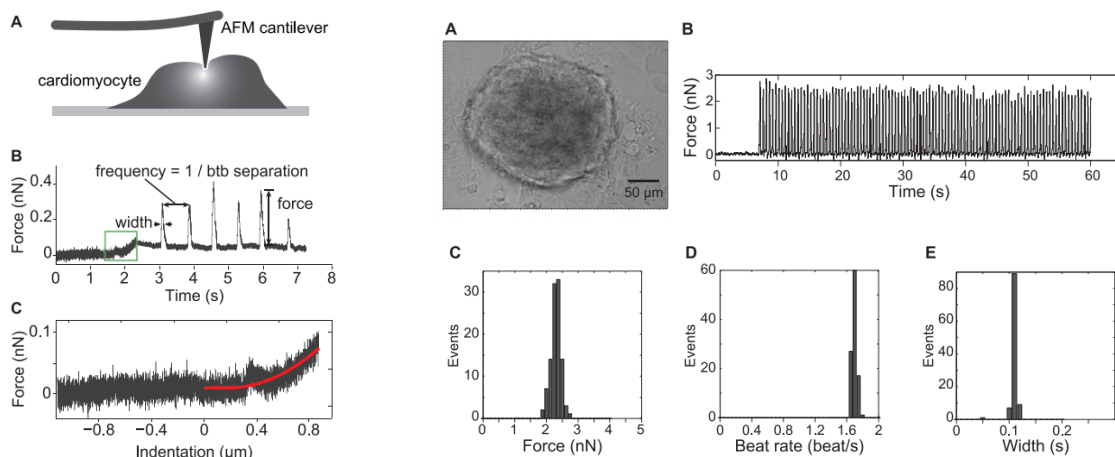
Mikroskopii atomárních sil (AFM) je v této práci věnována značná pozornost zejména vzhledem k faktu, že jde o významnou metodu frekventovaně používanou při měření kontrakce shluků kardiomyocytů (Embroid Body of Induced Pluripotent Stem Cell - Derived Cardiomyocytes, EB iPSC-CM) a je také využívána v praktické části této práce jako zdroj referenčních dat při měření kontrakce. AFM je poměrně novou metodou vycházející ze skenovací mikroskopie. AFM je taktéž mikroskopickou technikou, avšak zaměřenou zejména na skenování a analýzu trojrozměrného povrchu rostlinných a živočišných buněk a jejich kultur. Realizaci AFM v podstatě tvoří složité a náročné měřicí zařízení. Je založeno na jednoduchém principu, avšak vyžaduje pokročilou technickou realizaci. Měřicí část sestává z flexibilního držáku, na jehož konci je umístěna sonda malého rozměru s velmi ostrým hrotem. Tento hrot je při měření v kontaktu s povrchem buňky a jeho postupným posuvem dochází ke skenování

povrchu za pomoci laseru, jehož paprsek se odráží od konce držáku v místě, kde je umístěna sonda. Světlo je detekováno citlivým fotodetektorem rozděleným na několik segmentů. Tento systém je znázorněn na Obrázek 2.7. Zařízení tak lze v běžném případě považovat za pasivní. Informace o přibližování a vzdalování hrotu je po detekci přenesena na výstupní napětí vycházející z pozice dopadajícího laserového paprsku na fotodiodové pole. Výsledný signál deflektce držáku je získán při porovnání napětí na segmentech pole fotodiody (PDA) a digitalizaci výstupu. Za výhodnou lze považovat vysokou vzorkovací frekvenci. Generovaný snímek pak nese informaci o topologii povrchu. Přestože jsou techniky používané u AFM kontaktní, lze využít také režim bezkontaktní, který zajišťuje nepřímý kontakt s povrchem bez poškození živého vzorku.



Obrázek 2.7 – Schéma zařízení mikroskopie atomárních sil [64]

Metoda AFM je v současnosti hojně využívána pro hodnocení mechanické funkce svalových buněk. Úspěšně je používána v případě hodnocení mechanické funkce jednotlivých kardiomyocytů [65, 66] či jejich shluků anebo svalové tkáně [21]. Velmi častý případ aplikace AFM je uveden na komplexním příkladu na obrázku Obrázek 2.8. AFM, jak demonstruje schéma a ukázky výstupů v obrázku, slouží k dlouhodobému hodnocení mechanické aktivity shluků buněk iPSC-CM. Na shluk kardiomyocytů formující embryoidické těleso (EB) je položen hrot AFM, u kterého je sledována vertikální deflece v závislosti na pohybu horní hranice EB vlivem kontrakce. Výstupem je několikaminutový až několikahodinový signál pořízený s vysokou vzorkovací frekvencí (v tisících Hz). Signál obsahuje velmi přesné změny kontrakční síly a tyto změny jsou statisticky hodnoceny. Mezi používané postupy patří detekce špiček, hodnocení vzdálenosti špiček anebo šířky pulzů. Značnou výhodou AFM je také možnost kombinace s optickými metodami.



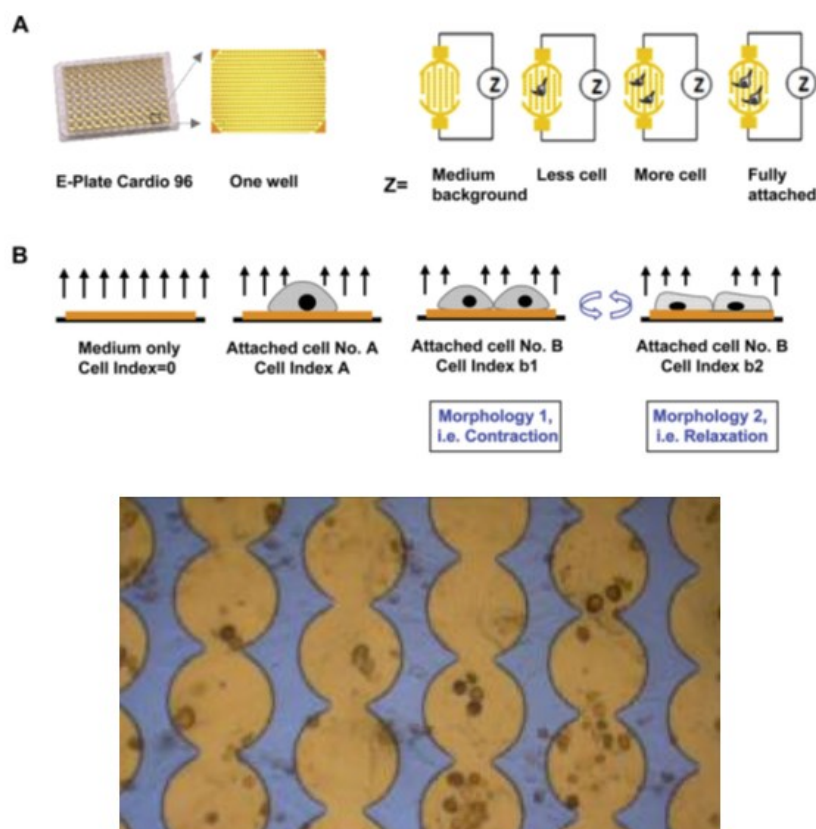
Obrázek 2.8 – Tvar měřeného shluku kardiomyocytů (EB) metodou AFM a způsob položení hrotu na EB (A); ukázka získaného silového signálu se špičkami kontrakce a vyznačením hledaných parametrů (B). Detekce nárůstu síly (C).

Obrázek 2.9 – Shluk kardiomyocytů (iPSC-CM EB), získaný 60s signál a statistické hodnocení detekovaných parametrů (síly, frekvence, šířky pulzů).

Využití mikroskopie atomárních sil bylo testováno také na jednotlivých dospělých kardiomyocytech potkana [67]. Ačkoli bylo možné signál získat, u měření se objevily komplikace s přitisknutím části kardiomyocytu, kde je umístěn hrot, k misce. Pravděpodobně tak dochází ke zkreslení signálu.

2.4 Impedanční metoda

Impedanční metody lze považovat za bezkontaktní, vzhledem k absenci přímého vniknutí měřicích elementů do buňky či narušení struktury buňky, přestože jsou měřicí elektrody ve velmi blízkém kontaktu s měřeným objektem. Metoda je výhodná v případě, kdy měřené objekty jsou adherovány na misce a přerůstají v jemnou tkáň. Příkladem mohou být kultivované neonatální, kuřecí a jiné kardiomyocyty, které jsou charakteristické velmi špatnou identifikací v mikroskopickém obraze a standardní postupy pro analýzu obrazu s využitím mikroskopie ve světlém poli, i s využitím kontrastních technik, jsou nedostačující. Metoda je založena na měření impedance u elektrodových polí speciálně vyhotovených tak, aby buňky indukovaly elektrickou impedanci v závislosti na svém tvaru a velikosti. Měřené kontrakce pak odpovídá cyklické změně této impedance v čase vlivem změny tvaru buněk při kontrakci [68]. Výhodou je vysoká vzorkovací frekvence a možnost simultánního měření velkého množství buněk ve více jamkách na jedné destičce. Princip metody je vyjádřen na obrázku:



Obrázek 2.10 – A) Vícejamkové pole s navařenými elektrodami na dně misek. Impedance odpovídající množství buněk v jednom elektrodovém systému. B) Nulový index buněk v případě jejich absence (vlevo), na další ukázce leva změna indexu vlivem jedné buňky přítomné na elektrodovém poli, na dalších dvou obrázcích pak změna indexu buněk u vyššího počtu buněk při relaxaci (b1) a při kontrakci (b2). Index vychází z měřené impedance [68]. Spodní obrázek tvoří mikroskopický snímek – ukázka reálného elektrodového pole a shluků adheovaných buněk.

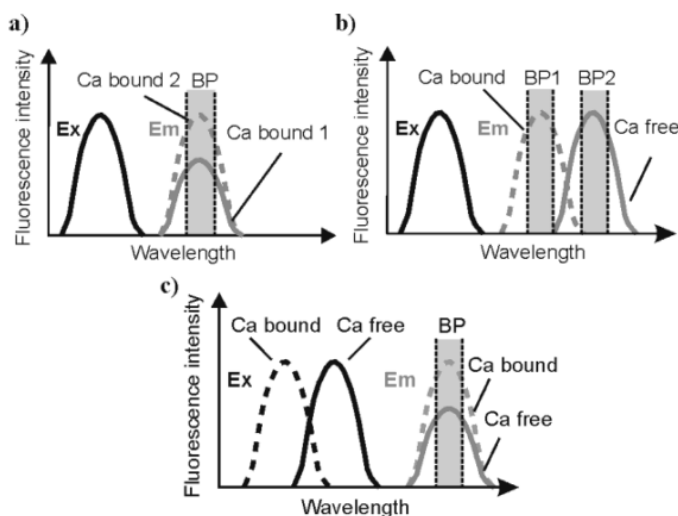
Obdobně lze za podobným účelem hodnocení tepu kardiomyocytů použít libovolné mikro elektrodové pole s odděleně rozmístěnými elektrodami (angl. Microelectrode Arrays, MEA).

2.5 Metody měření vápníkových transientů

Vápníkové transieny a ostatní vápníkové děje zachytitelné v kardiomyocytech jsou měřeny výhradně opticky s využitím různých technik. V podstatě je nejčastěji využívána běžná fluorescenční mikroskopie a konfokální fluorescenční mikroskopie. Obě metody vykazují odlišné výsledky a zacílení. Zatímco konfokální mikroskopie se využívá vzhledem k jejím vlastnostem k fluorescenčnímu zobrazování, kdy se jedná o detailní zobrazení úzké roviny měřeného objektu s vysokým rozlišením a rozeznatelností probíhajících dějů s využitím fluorescenčních indikátorů, standardní fluorescenční mikroskopie s využitím rychlé vědecké kamery s dostatečným rozlišením bývá zaměřena na měření vápníkových dějů v cytosolu. Obě metody jsou schopny sledovat rychlé vápníkové děje; první v případě omezení zorného pole a rozlišení, často s využitím rychlého (např. rezonančního) režimu skenování. Tedy s omezením na sledování detailu ve vybrané oblasti často mnohem menší než je oblast celé buňky a velmi často je využita metoda skenování v jednom či několika řádcích [69–74], která umožňuje sledování podélného, až velmi úzkého úseku, s velmi vysokou skenovací rychlostí a pro sledování vápníkových dějů u myocytů nachází časté uplatnění. Touto metodou bývají sledovány vápníkové jiskry a vlny ([75–78]) anebo vápníkové děje spjaté k jednotlivým buněčným elementům (vápníkových kanálů [79, 80], mitochondrií [81], sarkoplasmatického retikula [82, 83] či DHPR a RyR receptorů [84]). Za to

fluorescenční mikroskopie bez konfokálního režimu je vhodná a často využívána pro měření časových změn koncentrace intracelulárního vápníku [3, 85]. A to v celé svalové buňce anebo v rozsáhlé oblasti buňky, se záběrem velké optické roviny, na rozdíl od jedné velmi úzké roviny v případě konfokální mikroskopie.

Fluorescenčních indikátorů existuje velmi rozsáhlá skupina (přehled je např. obsažen v Tabulce 1 v [6]), které se liší dle oblasti vlnových délek pro excitaci (UV, viditelná oblast světla), měření koncentrace vápníkových iontů, dle oblasti zachycení ve vzorku (blízko membránové, mitochondriální, v rozsahu cytosolu apod.), závislosti na pH a v neposlední řadě dle své měřicí funkce jako poměrové nebo nepoměrové indikátory. Poměrové indikátory jsou schopny bezprostředně, bez dalších matematických výpočtů či kalibrace, schopny měřit koncentraci vápníkových iontů (volných a vázaných). Poměrové měření je rozlišováno v excitaci (Obrázek 2.11 c)) anebo v emisi (Obrázek 2.11 b)). Obrázek vyjadřuje emisní a excitační spektra jednotlivých skupin indikátorů a v oblasti fluorescenční emise také vymezené oblasti pro snímání. Mezi zástupce poměrového indikátoru v excitaci patří barvivo Indo-1, často využívané v současném měření vápníkových dějů u mapování srdeční aktivity na izolovaných srdcích [86, 87]. Indo-1 je excitováno v UV oblasti ve svém maximu na 338 nm a vykazuje silnou fluorescenci posuvem z oblasti emisního maxima kolem 475 nm v médiu bez vápníkových iontů k oblasti kolem 400 nm v případě vázaných vápníkových iontů. Barvivo Fura-2 patří mezi nejznámější indikátory skupiny poměrových indikátorů v excitaci. Fura-2 je často používán při aplikacích na srdečních buňkách nebo kulturách ve fluorescenční mikroskopii [31, 88–92], ale podobně jako Indo-1 také při měření vápníkových dějů na izolovaných srdcích [38]. Fura-2 vyžaduje střídavou excitaci na excitačních maximech 335 a 363 nm [6] a vykazuje fluorescenční emisi v oblasti kolem 510 nm ve viditelné oblasti světla.



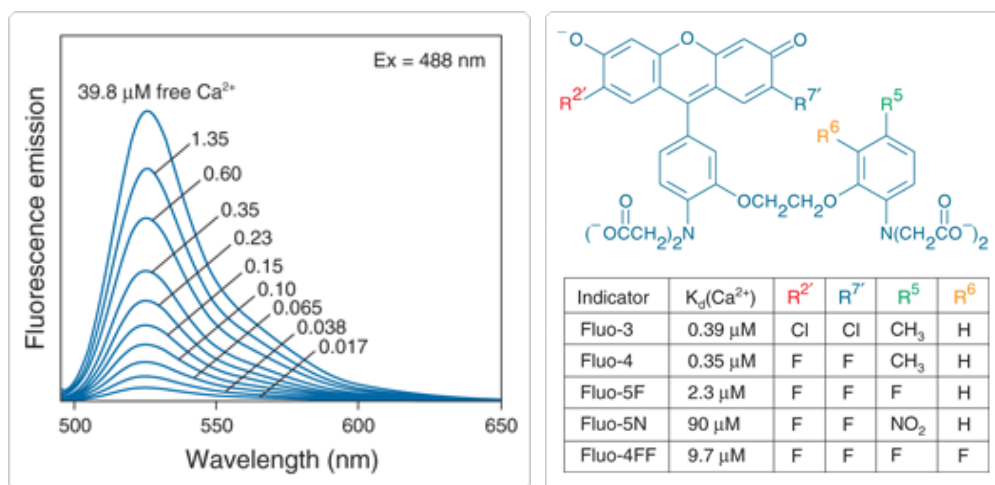
Obrázek 2.11 – Schéma vyjadřující tři skupiny vápníkových indikátorů pro poměrové a nepoměrové (a) měření. Poměrové měření lze rozdělit jako poměrové měření v excitaci (c) anebo v emisi (b). [93]

Obě zmíněné skupiny indikátorů vyžadují využití UV oblasti a také vzhledem k poměrové excitaci anebo snímání jsou náročné na technické experimentální vybavení. Z těchto důvodů je nejčastěji využívána třetí skupina – nepoměrové indikátory, které jsou excitovány pouze v jedné oblasti a vykazují fluorescenci v druhé oblasti, nejčastěji v obou případech ve viditelné oblasti světla. To s sebou přináší také značnou výhodu v mnohem menší náročnosti na měřicí zařízení, naopak má tato metoda značnou nevýhodu v současné reakci indikátorů na volné i vázané vápníkové ionty. Aby bylo možné dosáhnout měření koncentrace vápníkových iontů, je potřeba odlišit intenzitu jasu fluorescence F_0 (odpovídající

fluorescenci pozadí) od intenzity jasu fluorescence F (fluorescence se změnou intenzity v čase) a se znalostí disociační konstanty K_d a zajistit kalkulaci dle vztahu:

$$[Ca^{2+}] = K'_d [(\beta F/F_0) - (1/\alpha)] / (1 - \beta F/F_0) \quad (1)$$

kde β vyjadřuje poměr F_0/F_{max} a α vyjadřuje F_{max}/F_{min} , kde F_{max} je maximální intenzita jasu fluorescence a F_{min} minimální [94]. V běžném případě, kdy je zapotřebí získat pouze relativní změny fluorescence v závislosti na dynamice koncentrace vápníku v cytosolu je plně dostačující získat poměr F/F_0 [95]. To je možné zajistit pomocí obrazového zpracování s detekcí F_0 jako minimální hodnoty v každém cyklu z cyklického signálu změn fluorescence v závislosti na změnách koncentrace intracelulárních iontů vápníku. Zvyšování intenzity fluorescence v emisním spektru u Fluo-3 při excitaci laserem o vlnové délce 488 nm vyjadřuje Obrázek 2.12 vlevo. V obrázku jsou vyznačeny koncentrace volného vápníku v μM .



Obrázek 2.12 - Vlevo emisní spektrum Fluo-3 s ukázkou změny emisního spektra (závislost relativní fluorescence na vlnových délkách) v závislosti na koncentraci volného vápníku. Vpravo je uveden seznam variant indikátorů Fluo s chemickou strukturou a disociační konstantou.

Indikátorů Fluo existuje několik verzí, které se liší číselným značením. Jednotlivé verze se liší citlivostí na vápníkové ionty, cytotoxicitou a dalšími vlastnostmi. Existuje několik možností vpravení indikátoru do buňky, a to difúzí přes skleněnou elektrodu u metody patch-clamp, elektroporací, mikroinjekcí a dalšími. Výhodně je využíván postup s pomocí verze Fluo AM, která obsahuje AM ester štěpící se po vniku indikátoru do buňky. Až poté indikátor vykazuje silnou fluorescenci (při navázání na vápníkové ionty). Fluo a další indikátory verze AM lze aplikovat do média a vhodnou inkubací po proniknutí a štěpení uvnitř cytosolu dojde k aktivaci barviva [96]. Následně je vyžadován krok zajišťující propláchnutí média. V současné době je známa i vyšší verze s označením Fluo-8 AM a NW, kde NW vyjadřuje vlastnost absence potřeby promývání barviva po jeho aplikaci.

V některých publikacích je v případě současného měření akčního napětí a vápníku využíván také poměrový indikátor Rhod2, a to zejména vzhledem ke své spektrální pozici emisního spektra blíže k IR. Příkladem může být [97].

2.6 Metody měření akčního napětí

Fluorescenční bezkontaktní optické měření změn membránového napětí je nejčastěji možné s pomocí fluorescenčních sond, které vykazují změny své struktury v závislosti na změně membránového napětí.

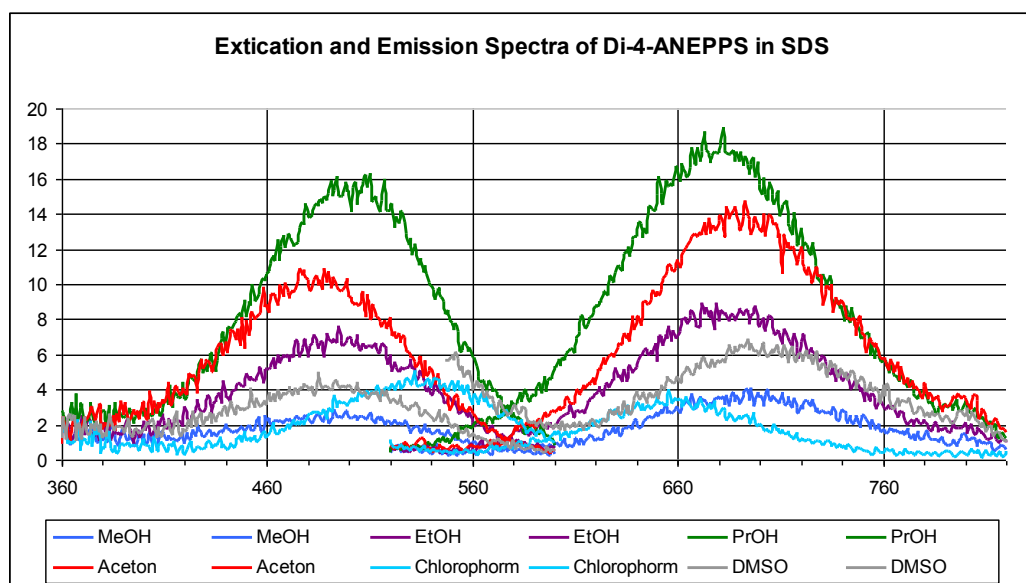
Výsledkem je změna intenzity jasu fluorescence sondy. Takovéto sondy mají široké uplatnění. Aplikací sond lze mapovat změny membránového potenciálu podél excitabilních buněk či v perfudovaných orgánech. Může být dosaženo vysokého prostorového rozlišení, které není možné získat s pomocí mikroelektrod či mikroelektrodoých systémů. Taktéž jsou vhodné pro měření na mitochondriích.

Nárůst a pokles membránového napětí, spojený s depolarizací a repolarizací, hrají významnou roli ve fyziologických procesech, potenciometrické sondy jsou důležitým nástrojem pro studium těchto procesů. Potenciometrické sondy jsou většinou kationtové nebo zwitteriontové styrylové struktury [98, 99]. Podle skupiny struktury je možné stanovit akumulaci v buňkách, odezvu sondy a toxicitu. Sondy je možné podle odezvy rozdělit do dvou základních skupin – na rychlé a pomalé sondy. Rychlé napěťové sondy fungují na základě změny jejich elektrické struktury a následně změnou svých fluorescenčních vlastností v závislosti na změně obklopujícího elektrického pole. Jejich rychlost odezvy je obvykle dostatečná pro detekci akčního napětí, řádově v milisekundách. Používají se na detekci AP excitabilních buněk – i jednotlivých neuronů a srdečních buněk, také celých tkání.

Změny intenzity fluorescence jsou obvykle malé, udávané změny dosahují hodnot 2 % [100] a někdy je uváděna hodnota až 10 % - jedná se o změnu vztaženou na napětí 100 mV. Pomalé napěťové sondy vykazují podobně jako rychlé sondy změnu fluorescence v závislosti na změně elektrického pole. Tato změna je podstatně větší. Typicky 1 % na jeden mV. Tato skupina však vykazuje pomalou odezvu a napěťové sondy nejsou vhodné pro měření dynamických dějů. Naopak rychlé napěťové sondy, které jsou vhodné pro měření elektrofyziologických jevů a jsou za tímto účelem často používány. Mezi nejčastěji používané skupiny patří skupiny ANEP (AminoNaphthylEthenylPyridinium) a RH (pojmenováno po Rina Hildesheim) [101].

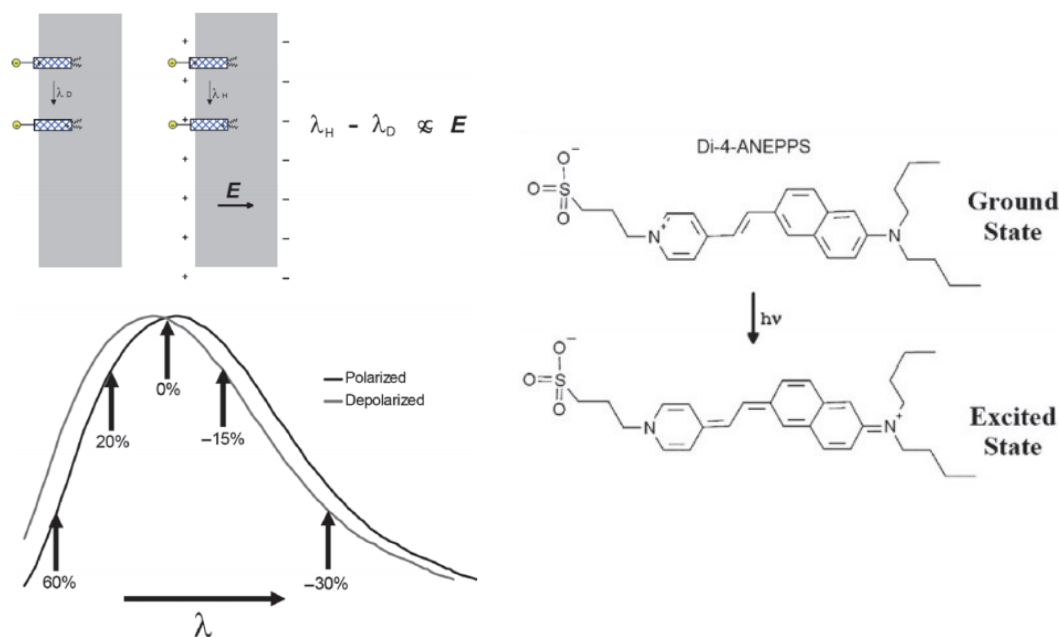
Pro praktické snímání rychlých změn transmembránového napětí na srdečních a nervových buňkách jsou vhodné dva zástupci skupiny ANEP – Di-4-ANEPPS a Di-8-ANEPPS. Ostatní se využívají pro jiné účely. Barviva skupiny ANEP [98] patří mezi nejcitlivější napěťově citlivé sondy. Vykazují změnu 10 % na 100 mV v oblasti intenzity fluorescence. Jsou uváděny univerzální [102], takže je možné je využít pro měření na různých typech tkání, ať už na srdečních buňkách či neuronech [98]. Napěťová odezva je dostatečná, umožňují časové rozlišení v řádu milisekund. Mezi barviva di-4-ANEPPS a di-8-ANEPPS je několik rozdílů. Di-4-ANEPPS se dostává do buňky rychleji, je proto vhodné pro krátkodobé experimenty s rychlou fází přípravy. Postačuje kratší fáze barvení buněk. Di-8-ANEPPS je stabilněji zachycen na vnější vrstvě membrány. Obě barviva vykazují dobrou fotostabilitu a malou toxicitu. Di-8-ANEPPS by měl být více fotostabilní a vykazuje menší toxicitu.

Spektrální vlastnosti se v publikacích různí. Znalost spektrálních vlastností přitom může být podstatná při správném nastavení systému (zejména emisních filtrů). Proto byla spektra di-4-ANEPPS experimentálně proměřena v různém prostředí a tato spektrální závislost na prostředí je výrazná (Obrázek 2.13). Navíc jsou barviva ANEP nefluorescentní ve vodných roztocích, což je značně výhodné, neboť nevykazují fluorescenci mimo navázaná místa (např. v médiu nebo cytosolu).



Obrázek 2.13 – Di-4-ANEPPS a jeho spektra v různém prostředí [103].

Princip odezvy napětově citlivého barviva na Obrázek 2.14. Sonda se naváže na vnější stranu membrány – zaklíní se dlouhým řetězcem do fosfolipidové vrstvy příčně (Obrázek 2.14 vlevo nahoře). Depolarizací membrány dojde k přesunu náboje ve struktuře (Obrázek 2.14 vpravo) a výsledkem je spektrální posun emisního spektra mírně doprava. Na obrázku jsou také vyznačeny maximální změny u konkrétních spektrálních bodů v případě depolarizace a repolarizace.

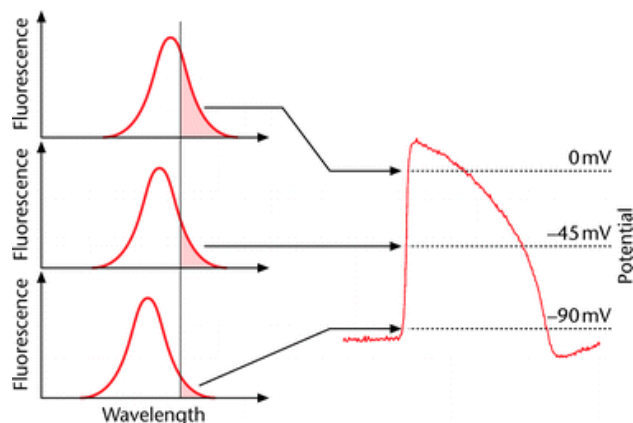


Obrázek 2.14 – Začleněný styrylového barviva (VSD) do membrány a následná reakce na její depolarizaci (vlevo). Vpravo struktura styrylového barviva a změna konformace v závislosti na depolarizaci membrány. [100]

Skupina barviv RH obsahuje větší množství barviv a slouží zejména pro funkční měření v neurologii. Přesto je v experimentech na srdeční tkáni také úspěšně využívána [90, 104, 105], a to právě RH 237. Stejně jako barviva skupiny ANEP, RH vykazují určitý stupeň excitačního a emisního spektrálního

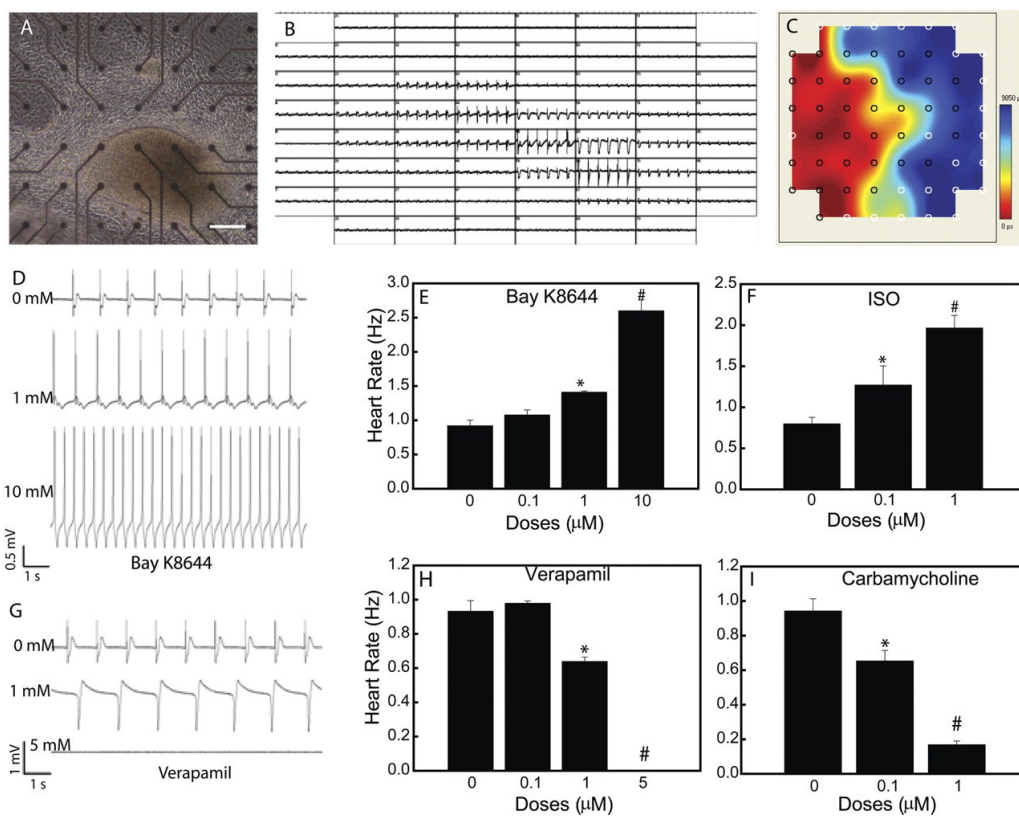
posunu v reakci na změnu akčního potenciálu. Podobně jsou také spektrální vlastnosti silně závislé na prostředí. Mezi další, v nedávné době, využívané sondy s vyzařováním v oblasti blízké IR patří sondy skupiny JPW [106, 107]. Ty vzhledem ke své vzdálené spektrální oblasti nachází uplatnění zejména v experimentech na tkáni, kde umožňují získání signálů i z hlubších rovin tkáně.

Princip měření akčního napětí nepoměrovou metodou s využitím je vyjádřen na Obrázek 2.15. Ve spektrální oblasti pravého laloku barviva je zařazen filtr typu horní propust. Posunem spektra sondy narůstá intenzita jasu fluorescence ve snímané oblasti rovnoměrně změně hodnoty membránového napětí. Intenzita fluorescence tak přímo odpovídá impulsu akčního napětí.



Obrázek 2.15 – Princip měření akčního napětí s využitím napětově citlivého barviva [108].

K měření akčního napětí na membráně buňky jsou využívány mikroelektrodotové kontaktní metody patch-clamp a v současné době se čím dál tím více uplatňuje využití mikroelektrodotového pole MEA. Zatímco metoda patch-clamp umožňuje měření změny membránového napětí celé buňky nebo jejího úseku, MEA, sestávající z velké skupiny malých elektrod vhodné velikosti rozmístěných na kultivační misce, navíc umožňuje sledovat šíření změny depolarizace v prostoru. MEA proto nachází široké uplatnění u měření elektrické aktivity kultivovaných kardiomyocytů. V současné době nachází uplatnění u měření elektrické aktivity u iPSC-CM, jak ukazuje příklad na Obrázek 2.16. Obrázek ukazuje princip měření s využitím MEA a příklad aplikace za účelem testování typu farmakologických látek („drug-screening“) u iPSC-CM. Záznam elektrické aktivity probíhá kontinuálně z jednotlivých elektrod mikročipu MEA s vysokou vzorkovací frekvencí (Obrázek 2.16 A, B). Současně je možné sledovat a analyzovat či vizualizovat signály z jednotlivých elektrod odděleně anebo v prostorové mapě. Na obrázku je uveden příklad získaných signálů během a po aplikaci testovaných látek. Časové změny frekvence tepů u kontrolního a testovacího měření jsou pak statisticky zpracovány.



Obrázek 2.16 – Mapování elektrické aktivity (A-C) s využitím mikroelektroodového pole s ukázkou efektu na frekvenci špiček v signálu při aplikaci farmakologických látek: Bay K 8644 (D and E), isoprenaline (F), verapamil (G a H) a carbamylcholin (I). [109]

3 Cíle práce

Cílem disertační práce je komplexní návrh optických metod pro současné měření intracelulárního vápníku a mechanické funkce izolované srdeční buňky a shluků iPSC-CM (Induced Pluripotent Stem Cell - Derived Cardiomyocytes) včetně přístrojového a programového systému. Cíl zahrnuje realizaci vybraných kombinací metod, návrh a realizaci vhodných postupů obrazového a signálového zpracování dat pro ověření na vhodné aplikaci se statistickým vyhodnocením.

Cíl lze rozdělit na jednotlivé podcíle takto:

1. Návrh a realizace metody pro simultánní měření vápníkových transientů a kontrakce embryonálních shluků iPSC kardiomyocytů pomocí moderních optických metod v kombinaci s kontaktní metodou mikroskopii atomárních sil.
2. Návrh a realizace optické metody měření kontrakce embryonálních shluků iPSC kardiomyocytů s využitím optické mikroskopie.
3. Návrh a realizace metod optického měření kontrakce izolovaných srdečních buněk s využitím optické mikroskopie se zaměřením na využití v simultánním měření vápníkových transientů a kontrakce.

Realizace a hodnocení metod zahrnuje:

- návrh vhodné kombinace fluorescenčních barviv tak, aby bylo simultánní optická měření uvedených parametrů a použitá fluorescenční barviva splňovala všechny požadavky pro vzájemnou kompatibilitu, spektrální vlastnosti, toxicitu a možnost aplikace v jednotlivých experimentech.
- realizace přístrojového a programového vybavení pro optické metody měření uplatňující se v separátním anebo simultánním měření uvedených parametrů.
- provedení analýzy získaných časových posloupností mikroskopických obrazů a extrahovaných signálů za účelem hodnocení navržených realizovaných metod.

Součástí cílů je ověření navržených metod na základě získaných dat a výsledků.

4 Optické metody měření

Kvalita získaných a hodnocených dat závisí na mnoha parametrech od samotné přípravy biologického materiálu po zpracování a užitý postup v hodnocení dat. Kvalitu měřených dat ve fázi akvizice dat (A) ovlivňují:

- příprava buněk (od izolace až po přípravu v inkubátoru),
- barvení buněk (koncentrace barviva, promytí, typ barviva, metoda vpravení barviva a inkubační doba),
- zobrazovací zařízení (objektiv, přenosová optika),
- zdroj excitačního světla,
- optické filtry,
- Zobrazovací zařízení.

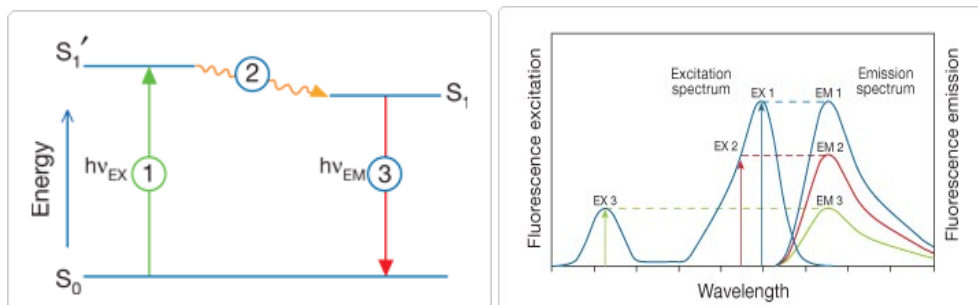
V další fázi (B) hodnocení získaných dat pak mají na kvalitu výsledků vliv:

- použité metody (před)zpracování obrazů,
- použité metody filtrace extrahovaných signálů,
- analýza filtrovaných signálů,
- zvolené postupy v hodnocení dat.

Pro optické měření se obecně využívá světelná mikroskopie a fluorescenční mikroskopie a jejich pokročilé techniky. Pro studium elektromechanických vlastností kardiomyocytů a jejich shluků byla v této práci z velké části použita světelná mikroskopie, přesněji mikroskopie pro procházející světlo s pozorováním objektů ve světlém poli a fluorescenční mikroskopie nebo jejich kombinace. Obě metody byly realizovány na jednom těle badatelského fluorescenčního mikroskopu (Olympus IX-71 anebo Olympus FluoView FV1200).

4.1 Světelná a fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie využívá děje zvaného fluorescence. Tento děj je výsledkem procesu, který se objevuje u určitých molekul – u fluorescenčního barviva nebo také fluoroforu. Děj, při kterém vzniká fluorescence, je znázorněn na *Obrázek 4.1*, kde je demonstrován formou zjednodušeného tzv. Jablonského diagramu. Modelový příklad ukazuje jeden elektron fluoroforu, který se nachází v základním elektronovém stavu S_0 . Po absorpci záření $h\nu_{\text{ex}}$ z externího zdroje světla (*Obrázek 4.1* vlevo) přechází do excitovaného stavu S_1' . V tomto stavu elektrony setrvávají typicky 1-10 ns. Během této doby vlivem vnitřních změn fluoroforu je část energie uvolněna (*Obrázek 4.1* vpravo) a elektron přechází do relaxačního stavu S_1 . Následně dochází k emisi fotonu s energií $h\nu_{\text{em}}$ a přechodu do základního stavu S_0 . [110]

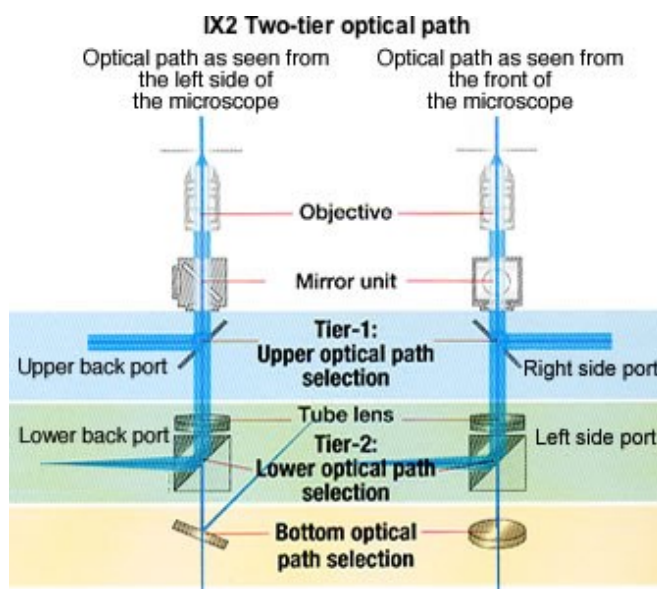
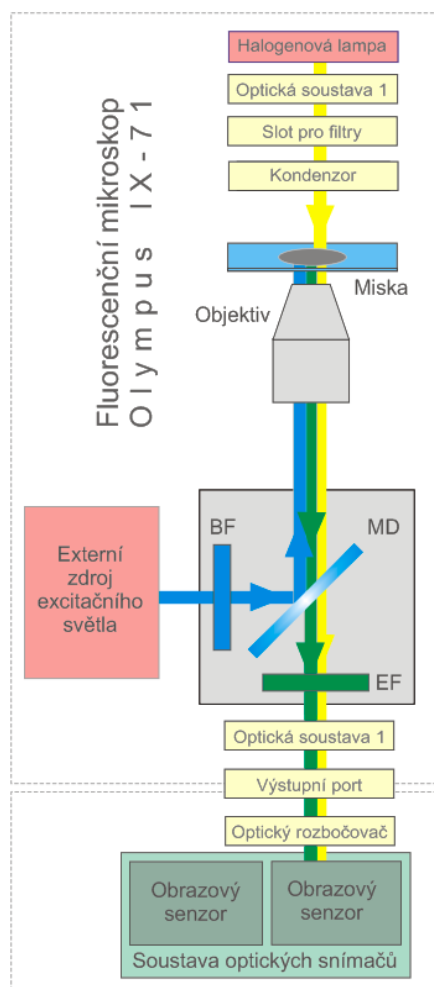


Obrázek 4.1 – Jablonského diagram s elektronovými pásmy (vlevo), spektrální oblast s odlišnými intenzitami jasu fluorescence při různé úrovni excitace. [110]

Jelikož je energie emitovaného fotonu menší než energie excitačního fotonu, dochází k vyzáření fotonu s vyšší vlnovou délkou, než je vlnová délka excitačního fotonu. Změnu energie mezi $h\nu_{ex}$ a $h\nu_{em}$ vyjadřuje Stokesův posuv. Vnitřní fluorescenční proces fluoroforu je cyklický – fluorofor je možné opakovaně excitovat a opakovaně vzniká emise fotonu. Pokud je fluorescenční látka rozpuštěna v roztoku, k excitaci dochází u velkého množství elektronů s různou pravděpodobností a fluorescenční barva je charakterizována excitačním a emisním spektrem [110]. Tato spektra vyjadřují pravděpodobnost absorpce záření nebo emise záření v určitém rozsahu vlnových délek. Excitační a emisní spektra jsou za běžných podmínek symetrická. Intenzita emisního spektra má velikost v závislosti na amplitudě excitačního světla na konkrétní excitační vlnové délce. Ukázka na *Obrázek 4.1* vyjadřuje tři různé pozice excitace a odpovídající odezvu v emisní oblasti. K ukončení jevu může dojít až v případě, že je fluorofor zničen v excitovaném stavu. Tento jev se nazývá fotovysvěcování (photobleaching). Emise fluorescenčního světla nastává téměř současně s absorpcí excitačního světla [111]. Časové zpoždění mezi absorpcí a emisí je velmi malé, řádově v mikrosekundách. Z tohoto důvodu je možné zpoždění i v případě monitorování velmi rychlých fluorescenčních dějů považovat za zanedbatelné.

Fluorofory lze podle svého zaměření či lépe principu funkce dále mohou dělit na fluorescenční značky, fluorescenční sondy a fluorescenční indikátory. Fluorescenční značky jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledovaným biomolekulám vážou kovalentní vazbou [110]. Primárně slouží k fluorescenčnímu značení a zobrazování různých biomolekulárních struktur. Fluorescenční sondy jsou také nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Fluorescenční sondy jsou fluorofory navrženy tak, aby vyvolávaly odpověď na určitý typ stimulu [110]. Příkladem mohou být napětově citlivé sondy, která reagují na změnu membránového napětí mírným spektrálním posuvem. Velký význam mají také fluorescenční indikátory. Těmi jsou označovány fluorofory, jejichž spektrální vlastnosti jsou citlivé na určitou látku. Příkladem mohou být indikátory citlivé na vápníkové ionty. [112]

Metody fluorescenční mikroskopie s kombinací se zobrazením v průchozím světle u světelné mikroskopie lze realizovat pomocí fluorescenčního mikroskopu, jehož zjednodušené schéma je na obrázku *Obrázek 4.2*. Obrázek vyjadřuje všechny základní prvky, které lze využít či ovlivnit za účelem realizace uživatelsky definovaných experimentů.



Obrázek 4.2 – Optický model invertovaného epi-fluorescenčního mikroskopu se základními prvky, které mají vztah k realizaci vícekanálových experimentů. BF – bariérový filtr, MD – dichroické zrcadlo, EF – emisní filtr. Napravo je optické schéma mikroskopu Olympus řady IX vyjadřující integrované optické prvky a optickou cestu, včetně ukázky dostupných výstupních portů. V pravé části obrázku je obsažen pohled z přední strany na mikroskop, na levé části obrázku z levého boku mikroskopu.

Základem je objektiv s malou ohniskovou vzdáleností, který zajišťuje fokusaci na malou oblast misky se vzorkem a zvětšení této oblasti s využitím průchozího světla a zobrazení ve světlém poli. Průchozí světlo je generované (povětšinou) halogenovou lampou umístěnou ve věži mikroskopu. Průchozí světlo prochází kondenzorem, který je čočkou či soustavou čoček, a jeho úlohou je jeho fokusace na vzorek. Průchozí světlo lze upravit přídatnými filtry umístěnými mezi zdroj světla a kondenzor. Na vzorku utlučené průchozí světlo je zachyceno objektivem a přeneseno optickou soustavou mikroskopu, kterou tvoří optické prvky zajišťující směrování světelného svazku na výstupní porty mikroskopu, na detektor.

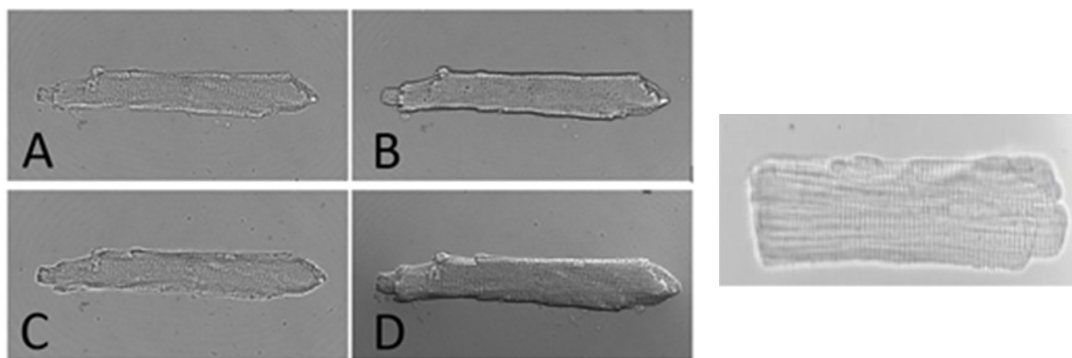
Fluorescenční mikroskop má od běžného mikroskopu řadu odlišností. Fluorescenční mikroskop, podobně jako běžný optický mikroskop, také vytváří zvětšený obraz preparátu. Obraz je ale založen na druhotném zdroji světla – na světle vyzařovaném přímo preparátem. K tomuto účelu je uzpůsobena optika mikroskopu a je přítomen přídatný zdroj pro generování excitačního světla. Objektiv fluorescenčního mikroskopu zajišťuje dvě hlavní funkce. Koncentruje excitační světlo na preparát a následně zajišťuje sběr emitované fluorescence z preparátu. Tento způsob realizace přináší nespornou výhodu. V tomto případě lze libovolně kombinovat fluorescenci s pozorováním v průchozím světle (ve

světlem poli). Této skutečnosti je využito v praktické části při realizaci zařízení pro současné snímání více parametrů.

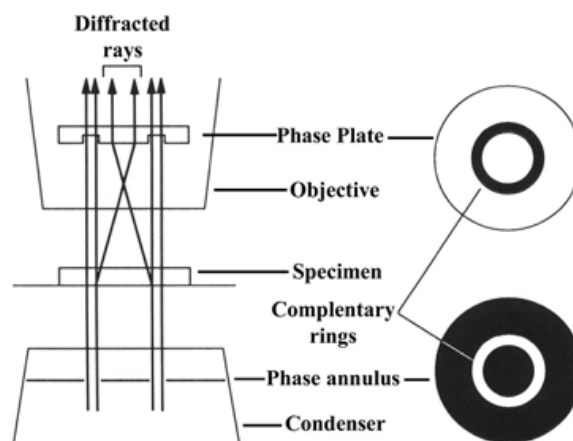
V případě využití mikroskopu pro buzení a snímání fluorescenčního záření je doplněn o širokopásmový zdroj excitačního záření umístěný mimo tělo mikroskopu a sadu filtrů umístěných ve fluorescenční kostce v optické trase mikroskopu. Z excitačního záření je nejdříve bariérovým filtrem vybráno vhodné pásmo vlnových délek pro excitaci konkrétního fluoroforu a následně je záření optikou fluorescenční kostky přes objektiv směřováno na sledovanou část vzorku. Současně je objektivem zachyceno přímé nebo rozptýlené fluorescenční emisní záření, které je nejdříve vyfiltrováno o nežádoucí vlnové délky (např. rozptýlené a odražené excitační světlo) a obdobným způsobem vyvedeno přes výstupní port mikroskopu ke snímači. V případě multikanálového měření je jeden snímač nahrazen soustavou snímačů a před snímače je předsazen optický rozbočovač. Při zobrazování kardiomyocytů tyto buňky, stejně jako různé typy adherentních či volných buněk, vykazují svá specifika. Stejně jako řada ostatních buněk, jsou kardiomyocyty částečně nebo téměř úplně transparentní. Jelikož mají izolované kardiomyocyty dospělého potkana poměrně velkou tloušťku, průchozí světlo je na hraniční sarkolemě výrazně utlumeno, taktéž dochází k jeho lomu a rozptylu, v závislosti roviny zaostření, a tak je pozorovaný objekt v obraze charakteristický tmavou hranicí a jemným vnitřním proužkováním. Na objektu jsou patrné zakončení (interkalární disky), které jsou velmi kontrastní.

4.2 Kontrastní techniky

V případě 2D zobrazování s využitím optické mikroskopie světlého pole tak vzniká snímek kardiomyocytu, který je velmi málo kontrastní. Snímek kardiomyocytu postrádá zejména informaci o vnitřní struktuře buňky a jeho výšce, či tvaru ve vertikálním směru. Zvýšení kontrastu napomáhají přidavné zobrazovací techniky, do kterých spadá zejména metoda mikroskopie s fázovým kontrastem, polarizační mikroskopie, mikroskopie s Normanského diferenciálním interferenčním kontrastem nebo případně také mikroskopie v temném poli.



Obrázek 4.3 – Obrazy kardiomyocytů pořízených na konfokálním mikroskopu ve světlem poli (A-D), A – se zaostřením na běžnou rovinu buňky, B a C se zaostřením nad a pod hlavní rovinu buňky a vzniklý efekt zesvětlení blízkého okolí sarkolemy, D – obraz získaný s využitím polarizační metody, objekt je ve výsledku značně plastický. Napravo je kardiomyocyt zobrazení kontrastní metodou ve s využitím fázového kontrastu [57].



Obrázek 4.4 – Princip fázového kontrastu u vzpřímeného mikroskopu. Podstatnými prvky jsou fázové kroužky obsažené v kondenzoru a objektivu mikroskopu. Úprava objektivu však způsobuje útlum emisního fluorescenčního světla procházejícího objektivem. Zdroj [113]

Kontrastní techniky jsou schopny v případě kardiomyocytů zvýraznit zakončení sarkolemy a také zvýraznit její charakteristickou proužkovou vnitřní strukturu. Zejména metoda fázového kontrastu je velmi často úspěšně využívána v konkrétních případech při měření kontrakce srdečních buněk pro zvýraznění obrazu ve světlém poli [57, 58, 114]. Tato a některé další techniky jsou však značně nevyhovující v případě současného měření s využitím mikroskopie světlého pole a fluorescenční mikroskopie, jelikož jsou založeny na modifikaci průchozího světla prvky zařazenými do společné optické cesty mikroskopu, která je v případě současného zobrazování ve světlém poli a fluorescenčním zobrazování využívána a způsobují tak útlum anebo zkreslení fluorescenčního světla. V případě metody fázového kontrastu je použit fázový objektiv se začleněným fázovým kroužkem, který na jedné straně umožňuje efekt fázového zobrazení, na straně druhé však způsobuje útlum procházejícího fluorescenčního záření o 30 % ([115]). Jakýkoli způsobený útlum fluorescence, i v jednotkách procent by byl nežádoucí, vzhledem k velké snímkovací rychlosti při fluorescenčním měření dynamických vápníkových jevů s výsledným malým akvizičním časem pro každý získaný snímek. Z těchto důvodů nebyly v experimentální části práce použity žádné obvyklé kontrastní techniky. Pro účely zvýšení kontrastu okrajové sarkolemy kardiomyocytů byla vyvinuta vlastní technika založená na úpravě zaostření objektu. Tato technika je blíže popsána v kap. 9.

4.3 Obrazové snímáče

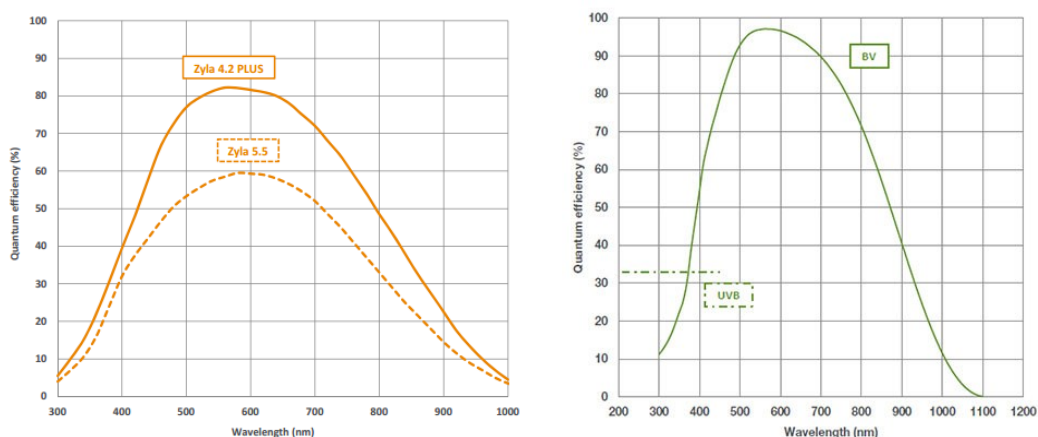
V elektrofyziologických experimentech, kde je zapotřebí při optickém snímání zajistit detekci velmi rychlých a přitom slabých změn intenzity fluorescence, hraje velice důležitou úlohu snímací zařízení. Ve většině případů je účelné současně zaznamenat prostorové změny sledovaného parametru. V této oblasti se tak uplatňují snímáče s dostatečným prostorovým a časovým rozlišením a současně s vysokou citlivostí. V řadě experimentálních sestav se zaměřením zejména pro prostorové optické monitorování elektrické srdeční aktivity s využitím napětově citlivých barviv, jsou využívány fotodiodové pole (PDA) [86, 87, 116–118]. V některých případech, pokud je změna membránového napětí snímána simultánně s dalším parametrem, např. se změnami koncentrace intracelulárního vápníku, je využito vícenásobné PDA [117, 119]. Fotodiodové pole jako snímač bylo úspěšně využíváno i v případě optického měření kontrakce jednotlivých kardiomyocytů [44, 60]. PDA nachází uplatnění zejména u sledování velmi rychlých optických dějů, např. pozorování spektrálního posunu napětově citlivého barviva, kde je zapotřebí vysoké vzorkovací frekvence [98, 99, 120]. Právě v této vlastnosti je

u PDA nesporná výhoda, neboť přenáší z jednotlivých elementů kontinuální elektrický signál, který je dále vzorkován, zatímco každý snímek CCD snímače integruje světelný tok v určitém časovém intervalu.

V případě mikroskopických aplikací při pozorování izolovaných buněk, kultur nebo tkáně se uplatňují rychlé vědecké kamery nesoucí označení ICCD, EMCCD a sCMOS [56, 121]. Oproti PDA se v mikroskopii uplatňují vzhledem k možnosti dosažení vysokého prostorového rozlišení [122]. Vědecké CCD a CMOS kamery je možné chladit na nízkou teplotu a dosahují tak minimalizování šumu a vysokého poměru signál-šum (SNR). Velice výhodný je také vysoký dynamický rozsah těchto snímačů [122]. U obrazových snímačů používaných v optickém měření elektrofyziologických dějů jsou velice významné tyto parametry:

- kvantová účinnost,
- prostorové rozlišení,
- snímkovací rychlost,
- poměr SNR,
- dynamický rozsah.

Kvantová účinnost (QE) vyjadřuje citlivost kamery na dopadající světlo. Přesněji se udává jako zlomek dopadajících fotonů, které se přemění na elektron, většinou v procentuálním vyjádření. QE silně závisí na vlnové délce, proto je pro maximální využití citlivosti kamery nutné brát ohled také na využívané vlnové délky fluorescenčního záření.



Obrázek 4.5 – Porovnání kvantové účinnosti a spektrální citlivosti kamer Andor Zyla 5.5 (vlevo, sCMOS) a Andor iXon3 860 (vpravo, EMCCD).

Akvizice dat v jednotlivých experimentech popsaných v kapitolách (7, 8 a 9) probíhá pomocí třech různých kamer umístěných samostatně anebo v kombinaci s využitím optických adaptérů určených pro rozšíření na více snímačů.

Digitální kamera Olympus i-Speed 3 s CMOS čipem

Kamera Olympus i-Speed 3 globálního výrobce Olympus poskytuje dostatečné rozlišení 1280 x 1024 px a přitom možnost dosažení velmi vysoké snímkovací rychlosti s tímto rozlišením (až 2000 fps). CMOS čip kamery i-Speed o velikosti 21,504 x 26,88 mm s rozměrem pixelu 24 mikronů vykazuje nízké úrovně šumu, zejména vzhledem k velkému rozměru. Jedná se o optickou kameru s ne příliš vysokou citlivostí a proto je využívána pro detekci průchozího světla za účelem sledování změn velikosti kardiomyocytu při kontrakci ve světlém poli.

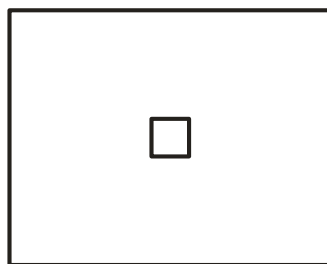
Digitální kamera Andor EMCCD iXon 3 860

Jedná se o fluorescenční kameru výrobce Andor Technology Ltd, Severní Irsko, s malým rozlišením (128 x 128 px), ale velmi vysokou kvantovou účinností a současně vysokou snímkovací rychlostí až 512 fps v tomto rozlišení. Vyniká také vysokým dynamickým rozsahem. U této kamery je zajištěna 14 bitová digitalizace s velmi vysokou čtecí rychlostí (až 1 MHz). Kamera obsahuje CCD čip o velikosti 3,1 x 3,1 mm, velikost jednoho pixelu je 24 x 24 μ m. Kamera je typu EMCCD, umožňuje zvýšit citlivost zesílením signálu přímo na čipu. Kamera Andor iXon 3 860 vykazuje vysokou kvantovou účinnost v rozsahu vlnových délek 500 - 700 nm >90%. V oblasti maximální spektrální emise fluorescence vápníkového indikátoru Fluo-4 přesahuje 95%. Je proto využívána pro sledování rychlých změn dynamiky vápníku v cytosolu jednotlivých izolovaných kardiomyocytů. V druhé řadě také jako kamera pro měření kontrakce těchto kardiomyocytů.

Digitální kamera Andor Zyla 5.5

Jedná se o kameru výrobce Andor Technology Ltd, Severní Irsko, s obrazovým čipem typu sCMOS se vyznačuje vysokým rozlišením a přitom relativně vysokou citlivostí (v oblasti maximální spektrální emise fluorescence vápníkového indikátoru Fluo-4 mezi 50 a 60 %). Kamera nabízí vysoké základní rozlišení 2560 x 2160 (5,5 MPx) a variabilitu snímkovacích rychlostí v maximální výši 100 fps v závislosti na zvoleném rozlišení. Značnou výhodou kamery je oproti ostatním fluorescenčním kamerám s mnohem menším prostorovým rozlišením možnost zobrazení ve vysokém rozlišení pro nastavení zorného pole a výběru oblasti zájmu a následné snížení rozlišení na úroveň přibližně 1500 x 1500 Px, která umožňuje získat záznam s dostatečnou snímkovací rychlostí (> cca 50 fps).

Kamery i-Speed 3 a iXon 860 se poměrně liší velikostí čipů a způsobem akvizice. Tento aspekt se silně projeví na velikosti a kvalitě obrazů a potřeby přídavných kroků při současném měření s využitím optického rozbočovače. Rozdílná velikost čipů těchto kamer je demonstrována na Obrázek 4.6. Zorné pole na výstupu mikroskopu a dále v optické trase optického adaptéru je kruhové, s průměrem 25 mm. Velikost čipu kamery Olympus i-Speed 3 tak velikostí mírně přesahuje promítané zorné pole a proto se na čip promítá jeho část. Pokud jsou současně použity snímače i-Speed 3 a iXon 860, je možné využít pouze malou oblast snímků pořízených kamerou i-Speed 3 odpovídající velikosti menšího čipu iXon 860 – oblast, která je pro obě kamery společná.



Obrázek 4.6 - Porovnání rozměrů čipů kamer Olympus i-Speed 3 (větší) a Andor iXon 860.

Nastavení kamery Olympus i-Speed 3 probíhá pomocí ovládacího externího panelu. Záznam probíhá nejdříve na vnitřní paměť o velikosti 4 GB umístěnou v kameře, po ukončení záznamu je videosekvence (HSV, high-speed video, Olympus) přenesena do PC, kde je transformována na s využitím SW balíčku Olympus do bezkompresního formátu AVI pro další zpracování. Záznam kamerou Andor iXon 3 je realizován v softwaru Andor Solis dodávaném výrobcem. V softwaru je možné nastavit kroky a parametry akvizice. Po ukončení je záznam možné uložit ve formátu SIF anebo přímo exportovat do bezkompresního videosouboru. Andor umožňuje využití SDK softwaru Solis pro LabVIEW pro

uživatelské zajištění kontinuálního přenosu a zpracování snímků v reálném čase během měření. Při akvizici snímků kamerou Andor iXon3 je zvolen mód *Fast Kinetics*, který umožňuje sejmutí série snímků o zvoleném počtu a délce záznamu. V případě měření fluorescenčních dějů je zapnuto „on-chip“ zesílení v rozsahu 0 – 300 x dle potřeby zesílení signálu. Při akvizici je využito módu *Frame Transfer*, který způsobem čtení snímků z čipu dokáže ve výsledku prodloužit expoziční dobu v každém cyklu na maximum a minimalizovat časovou prodlevu mezi jednotlivými expozičními cykly.

Binning	Array size				
	128 x 128	64 x 64	32 x 32 & 128 x 32	16 x 16	128 x 1
1 x 1	513	943	1639	2500	4348
2 x 2	926	1588	2439	3333	-
4 x 4	1515	2272	3125	3704	-

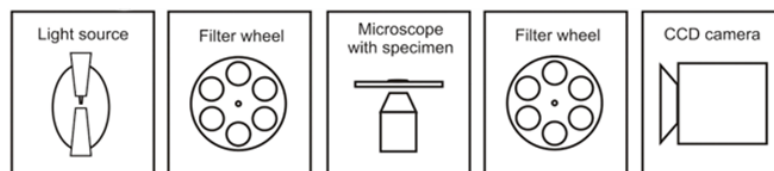
Array Size	Zyla 5.5 USB 3.0	
	Rolling Shutter	Global Shutter
2560 x 2160	40 (30)	40 (30)
2048 x 2048	53 (40)	52 (39)
1920 x 1080	107 (80)	98 (80)
512 x 512	422 (422)	201 (201)
128 x 128	1691 (1691)	716 (716)
2048 x 8 (FCS mode)	13568 (10176)	4008 (4008)
1024 x 8 (FCS mode)	27057 (27057)	4008 (4008)

Obrázek 4.7 – Příklad snímkovacích rychlostí kamery Andor iXon 860 (nahore) a Zyla 5.5 (dole) v případě variability rozlišení a možnosti funkce „binning“ – sloučení pixelů v celek a u Zyla 5.5 s rozlišením užití globální a rolovací uzávěrky. [123, 124]

4.4 Současné měření více parametrů

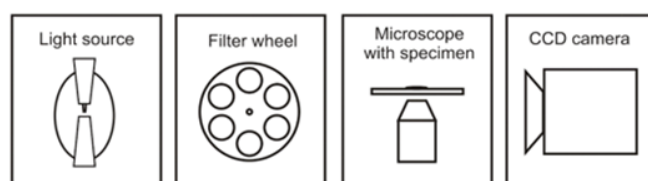
Náročné fluorescenční experimenty zaměřené na multiparametrické měření procesů v rámci vazby excitace-kontrakce, zejména ty s požadavkem na měření s využitím většího počtu fluorescenčních barviv či využívající moderních fluorescenčních sond, jejichž spektra vykazují dynamické změny, s sebou přináší zvýšené nároky na měřicí zařízení. Zejména pak na opto-mechanickou část zařízení. Úprava měřicího systému se může projevit v konstrukci samotného fluorescenčního mikroskopu nebo může být zajištěna pomocí přídatných komponent umístěných na výstupu mikroskopu v pozici mezi snímáním a mikroskopem – optickými adaptéry. Vícekanálové zobrazování anebo fluorescenční měření lze realizovat ve dvou rovinách, a to buď v časové rovině, kdy dochází ke střídání (resp. přepínání) kanálů v čase, anebo v prostorové rovině, kdy je vícekanálové měření zajištěno rozdělením optické cesty na několik paralelních cest - jednotlivé cesty přenášejí a promítají oddělené obrazy na jedno či více snímacích zařízení současně. Oba způsoby se dají navíc kombinovat.

Vícekanálové zobrazování statických snímků nebo velmi pomalých dějů je v současné době u fluorescenčního mikroskopu realizováno pomocí rotačního nebo posuvného výměníku sad fluorescenčních filtrů. Sady filtrů jsou uloženy ve fluorescenčních kostkách. Mechanický, často elektronicky řízený, karusel obsahuje sadu fluorescenčních kostek, které jsou v definovaných časových intervalech v definovaném pořadí přepínány. Zajišťuje tak postupnou výměnu fluorescenčních pásem a v těchto okamžicích dochází k pořízení fluorescenčních snímků. Sada fluorescenčních snímků je dále zpracována do jednoho uměle dobarveného snímku. V principu se jedná o přepínání kanálů v čase. Sestava je schematicky znázorněna na Obrázek 4.8.



Obrázek 4.8 – Sestava potřebných prvků při realizaci vícekanálového zobrazování s přepínáním filtrů v čase. Při přepínání dochází k výměně filtrů v oblasti excitace a také v oblasti emise, a to pomocí fluorescenčních kostek.

Obdobnou možnost časového přepínání umožňuje fluorescenční zdroj, který má interně nebo externě zařazený mechanický přepínač filtrů. Tento způsob je výhodný zejména v případě využití poměrových indikátorů a sond, kterými jsou např. vápníkový indikátor Fura-2, kde je zapotřebí zajistit excitaci na dvou excitačních vlnových délkách, zatímco je fluorescenční emise měřena v jednom pásmu (Obrázek 4.9).

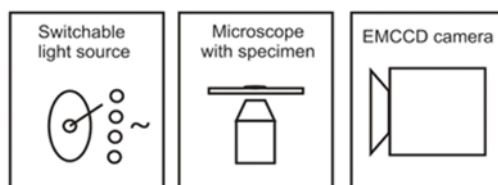


Obrázek 4.9 – Schematické znázornění poměrového měření v oblasti excitace. Ke střídané výměně dvou a více filtrů dochází jen v oblasti excitace, přímo u fluorescenčního zdroje.

V případě použití více fluorescenčních barviv současně musí být dojit také k přepínání emisních filtrů, anebo může být použit vícepásmový filtr (dichroické zrcadlo s více úzkými pásmy, Obrázek 4.11) v sestavě fluorescenční kostky.

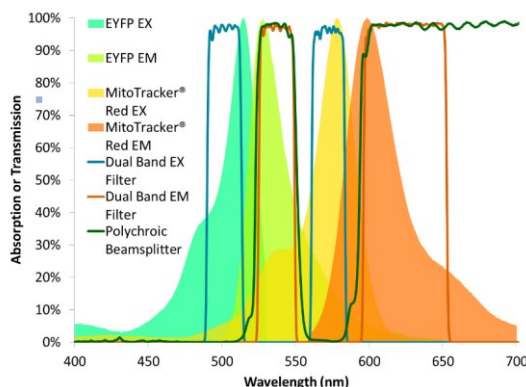
Dosud zmíněné způsoby mechanického přepínání kanálů v čase se vyznačují nízkou rychlostí přepínání. Z konstrukčního hlediska jsou rotační měniče filtrů rozměrné. Vzhledem k faktu, že jsou náročné na přesnost a mechanické vlastnosti vedoucí k co nejnižším vibracím, potřebují objemné konstrukční prvky zajišťující jejich stabilitu, rotační schopnost a potřebné vlastnosti. Rotační kotouč s filtry může být různého průměru a s různým tvarem a počtem otvorů pro filtry. Nejčastěji se nachází ve variantě s šesti až osmi kruhovými otvory pro 25 mm filtry, neboť tato velikost odpovídá průměru kruhové cesty mikroskopu. Pro aplikace vyžadující rychlou výměnu filtrů je stěžejním parametrem čas potřebný pro přepnutí mezi filtry. Většina filtrů je konstruována pro výměnu s prodlevou 50 až 100 ms [16]. U rychlých filtrů se tato doba potřebná pro přepnutí snižuje až na 40 ms. Pro účely rychlé výměny jsou filtry plně motorizované a vybavené uzávěrkou pro přesné vymezení intervalu, kdy je optická cesta plně průchozí. Nejrychlejší rotační měniče filtrů dosahují časového intervalu přechodu filtrů až 10 – 30 ms. Příkladem je externí zdroj světla s integrovaným s rotačním měničem filtrů Leica EL6000 [17].

V současné době se v případě potřeby přepínání kanálů v oblasti excitace uplatňují fluorescenční zdroje založené na sadě rychle sepínatelných výkonných LED. Skupina úzkopásmových LED obsažených ve zdroji může být zapnuta v různé kombinaci současně, anebo mohou být přepínány s velmi malou časovou prodlevou (1 - 2 ms, Excelitas X-Cite [125]). Excitační LED jsou vhodně prostorově rozloženy a pomocí sestavy dichromatických zrcadel kolimovány do společné optické cesty. Schematické znázornění řazení prvků zařízení je na Obrázek 4.10.



Obrázek 4.10 – Sestava s využitím rychle přepínatelného excitačního zdroje.

Sestava nachází uplatnění v případě využití poměrového měření u vápníkových indikátorů s potřebou přepínání dvou excitačních vlnových délek, nebo také v případě rychlých napětově citlivých sond ([126]). K pořízení sekvence snímků dostačuje jeden snímač a přitom není zapotřebí střídání filtrů v oblasti emise. V případě využití více fluorescenčních barviv by ve většině případů vzhledem k překryvu často širokých excitačních spekter jednotlivých barviv docházelo k excitaci více barviv současně, pokud nejsou dostatečně spektrálně vzdáleny. Pro tento účel je vhodné vícepásmové (multichromatické) zrcadlo (resp. filtr), které propouští pouze potřebná pásma. Tímto způsobem lze efektivně oddělit excitační pásma i emisní pásma jednotlivých barviv. Příklad spektrálních oblastí pro excitaci a emisi u tohoto typu filtru je uveden na Obrázek 4.11.



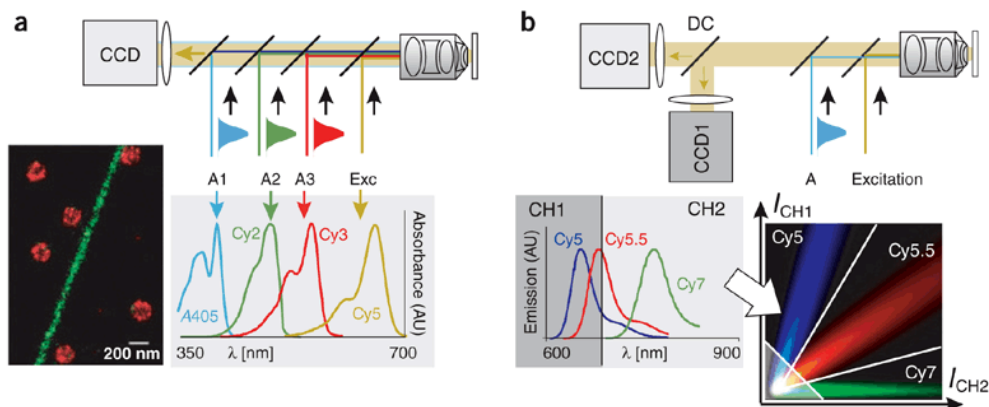
Obrázek 4.11 – Ukázka realizace fluorescenčního měření dvou barviv (MitoTracker a EYFP) s využitím duálních excitačních a emisních filtrů umístěných v jedné fluorescenční kostce. Zdroj [127]

Zdroj s dvojicí LED s velmi rychlým přepínáním (375 Hz) je např. úspěšně použit v [126] pro poměrové měření v excitaci – při excitaci napětově citlivé sondy Di-4-ANEPPS s využitím v oblasti měření napětové odezvy membrány.

4.5 Prostorová separace kanálů

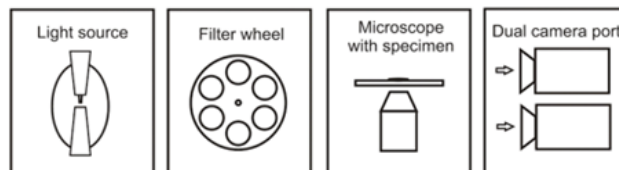
Tento typ řešení vícekanálového snímání nahrazuje řešení se sekvenční výměnou filtrů v čase v oblasti experimentů, kde je potřeba dosáhnout vysokého časového rozlišení. Časové rozčlenění je v tomto případě závislé pouze na vlastnostech kamery a zvolené snímkovací rychlosti. Princip simultánního měření s využitím více fluorescenčních kanálů bez nutnosti časového přepínání je založen na současné vícenásobné excitaci použitých fluorescenčních barviv, následném přenosu obrazu, který je výsledkem emise fluorescence jednotlivých barviv, společnou optickou cestou tělem mikroskopu na vhodný výstupní port. Poté dochází k jejich rozdělení různými způsoby pomocí přídavné opto-mechanické konstrukce na jeden či více snímačů. Takováto zařízení, již ve své podstatě, vzhledem k absenci pohyblivých mechanických dílů, eliminují možné chyby spojené s pohybem prvků v zařízení a vznikajícími vibracemi nebo nepřesnosti způsobené chybnou časovou synchronizací a pohybem filtrů a nesou řadu dalších výhodných vlastností. Schéma vyjadřující základní, nejčastěji používaný, princip,

kdy je na výstupu dosaženo optického rozdělení obrazů s využitím dichromatického zrcadla, je znázorněno na Obrázek 4.12.



Obrázek 4.12 – Ukázka vícekanálového zobrazování s využitím barviv (A405, Cy2, Cy3, Cy5) s využitím sady dichromatických zrcadel a separátními excitačními vlnovými délkami s využitím jednoho snímače (vlevo) a varianta s využitím současné excitace skupiny barviv (Cy5, Cy5.5, Cy7) a naopak využitím více snímačů s optickým rozdělením pomocí dichromatických zrcadel.

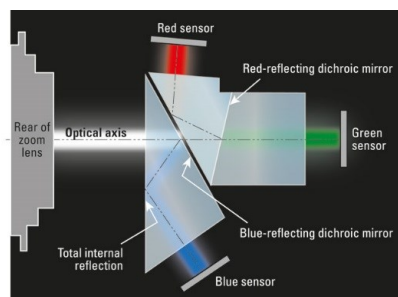
Ze schématu je patrné, že pro každý využitý kanál je potřeba separátní obrazový snímač. V tomto případě je nutné zajistit přesnou časovou synchronizaci pořízení obrazových sekvencí jednotlivých snímačů. Snímače mohou mít odlišné prostorové vlastnosti (rozlišení, velikost pixelů, velikost čipu), musí však umožňovat záznam se shodnou snímkovací rychlostí nebo jejím násobkem. Alternativně je však možné až ve výpočetním zařízení zajistit synchronizaci časovou interpolací extrahovaného signálu z obrazu. Optické rozdělení na dva či větší počet snímačů je obvykle realizováno pomocí externího rozbočovače s integrovanými optickými prvky s úchyty pro kamery.



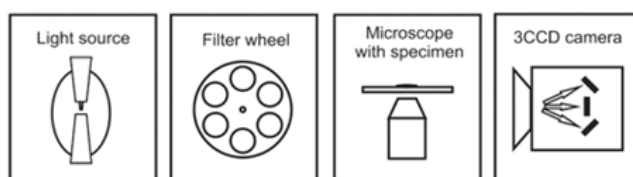
Obrázek 4.13 – Schematické znázornění umístění řazení prvků v případě využití optického rozbočovače. V rotačním výměníku filtrů je vybrán vhodný jedno nebo vícepásmový filtr pro excitaci. Emisní filtry jsou obvykle umístěny před snímači. Sestavu lze realizovat také s vícepásmovým zdrojem (např. zdrojem se skupinou současně aktivovaných LED).

V případě, že je využit port mikroskopu s fokusovaným výstupem, způsobuje omezení rozměru optického rozbočovače a snímačů do maximální vzdálenosti dané konkrétním použitým mikroskopem a danou ohniskovou vzdáleností fokusace. Pro takovýto případ je často vhodné využít nefokusovaný port a fokusaci zajistit jednotlivě u snímačů, anebo doplnit optické řešení soustavou čoček pro prodloužení ohniskové vzdálenosti. Ve schématu na Obrázek 4.12 fokusaci znázorňují čočky představené před snímače. V nejjednodušší verzi se dvěma snímači lze zařízení realizovat jako přídatný adaptér, který je připojit k výstupnímu portu mikroskopu a k němu jsou připojeny dvě kamery. Tento způsob vícekanálového adaptéru využívá řada komerčních zařízení (Photometrics DC2 [128] nebo Andor TuCam [129]), avšak ve vědecké praxi a prezentovaných publikacích jsou mnohem častěji využívány uživatelsky přizpůsobeny pro konkrétní řešení experimentální sestavy.

Uvedené technické řešení je možné zajistit i v rámci jednoho těla obrazového snímače v případě 2 a 3 [130] čipových černobílých nebo barevných kamer (viz příklad na Obrázek 4.14).

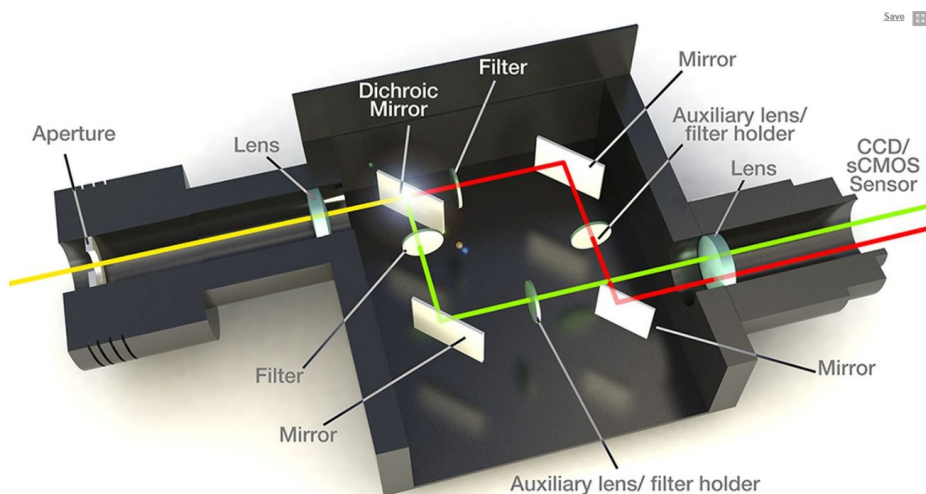


Obrázek 4.14 – Princip tříkanálové kamery se třemi oddělenými CCD snímači. Rozdělení optické osy na tři spektrální části probíhá pomocí dichromatických zrcadel. Zdroj [131]

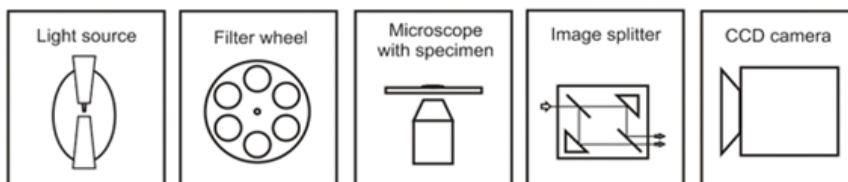


Obrázek 4.15 – Schematické znázornění sestavy s využitím vícečipové kamery. Obdobným způsobem jako u sestavy uvedené na Obrázek 4.13 je nutné zajistit výběr vlnových pro excitaci aplikovaných barviv.

O snížení počtu nákladných snímačů a eliminaci potřeby přesné synchronizace se snaží další řešení, které využívá pouze jednoho obrazového senzoru. Princip je vysvětlen na následujícím modelu komerčního zařízení (Andor Optosplit, Obrázek 4.16).

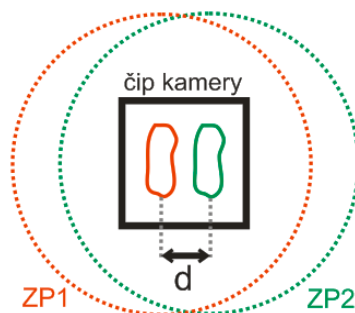


Obrázek 4.16 - Optické zařízení Andor Optosplit. Vstupující paprsky jsou spektrálně rozděleny na dvojici dichromatických zrcadel a po filtraci jsou druhou sadou zrcadel svedeny do společné cesty, avšak s malým posunem.



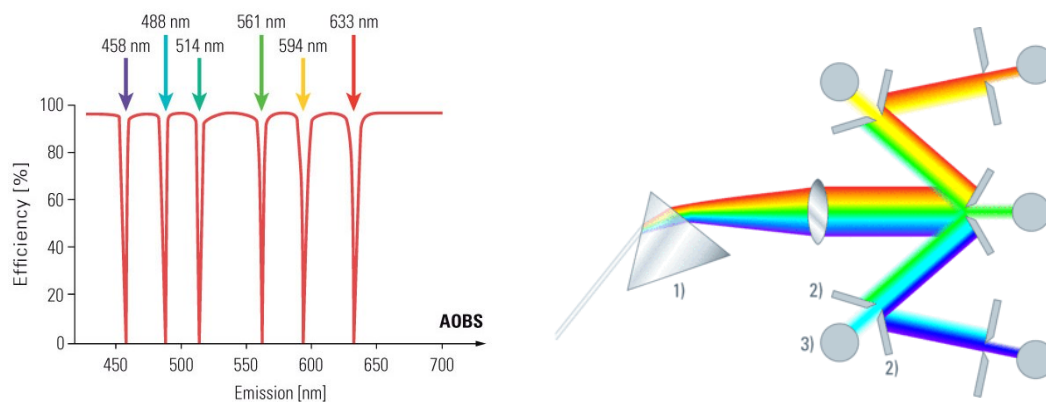
Obrázek 4.17 – Sestava s využitím optického adaptéru, který je připojen na výstupní port mikroskopu a k němu je připojena jedna kamera. Vhodný excitační filtr musí zajišťovat současnou excitaci dvou použitých barviv.

Zařízení obsahuje čtveřici dichromatických zrcátek, které vstupní paprsky světla rozdělí na dvě kolmé optické cesty a následně po opětovném spojení do jedné optické cesty promítne obrazy s velmi malým definovaným posunem na jeden obrazový snímač současně. V zařízení může dojít k přídatné filtraci a korekci nepřesností dalšími optickými prvky. Čočky na počátku a na konci slouží ke kolimaci svazku a následně po optické úpravě k jeho fokusaci na snímač. Na snímači ve skutečnosti dochází k překryvu spektrálních obrazů, jak je znázorněno v nákresu na schématu (Obrázek 4.18). Uvedený princip funguje v praxi správně za předpokladu, že obsažené dva obrazy nemají příliš odlišnou intenzitu jasu, aby se společně vešly do dynamického rozsahu snímače. Navíc, pozadí z jedné spektrální oblasti (ZP1, Obrázek 4.18) se promítá do druhé (ZP2, Obrázek 4.18) a opačně. Jakékoli další objekty nebo částice (prachové částice, bubliny v médiu apod.) tak mohou způsobit nežádoucí překryv měřených objektů.



Obrázek 4.18 – Obrazový čip kamery čtvercového tvaru (např. Andor iXon 860), na který jsou promítnuty dva objekty ze dvou kruhových zorných polí z červené spektrální oblasti ZP1 a zelené spektrální oblasti ZP2 s nastaveným horizontálním posunem (d) a případným nežádoucím vertikálním posunem vzniklým nepřesností realizace opto-mechanického provedení systému. Objekty znázorňují dva podlouhlé izolované kardiomyocyty..

V tomto případě jsou také kladeny nároky zejména na rozlišení obrazového snímače, neboť je prakticky využita jen jeho polovina či ještě menší část. Objekty tak nemohou být příliš zvětšeny a tedy sledovány ve velkém detailu. Limitující je také snímkovací rychlost, neboť ta klesá s velikostí snímače a navíc jsou tak kladeny zvýšené požadavky na výpočetní zařízení, přenos a ukládání dat během snímání. Zařízení jsou obdobně jako verze ve formě rozbočovače pro dvě kamery komerčně dostupná (Hamamatsu W-VIEW GEMINI [132], Photometrics DVA [133]), jsou ale prakticky využívána v oblasti sledování dynamických dějů u kardiomyocytů zřídka. Mezi nejmodernější systémy vícekanálového snímání patří kombinace laseru bílého světla (WLL / White Light Laser, NKT Photonics [134]), akustooptických filtrů a separátních snímačů, na které jsou promítány oddělené spektrální části za přispění mechanicky řízených odrazných zrcadel. Laser bílého světla v tomto případě zajišťuje širokopásmový zdroj světla, kde výběr vhodných vlnových délek pro vícekanálovou excitaci fluorescence zajišťují akustooptické filtrační prvky. Akustooptické krystaly na základě piezoelektrického jevu mění spektrální propustnost a dokáží v čase rychle přepínat úzká pásma vlnových délek. Nahrazují tak standardní dichromatická zrcadla. Technické řešení nachází uplatnění v konfokální mikroskopii (Leica Microsystems, konfokální mikroskop TCS SP8X).



Obrázek 4.19 – Princip AOBs filtru, který vytváří ve spektru velmi úzká pásma pro laserové čáry (vlevo). Vpravo je zobrazen detekční systém používaný u konfokálního mikroskopu Leica (TCS SP8). 1) značí optický hranol, na kterém dochází k prostorovému rozložení světelného svazku s více spektrálními oblastmi a následně je pomocí zásuvných mechanických prvků (2) spektrum dále rozděleno a odraženo na příslušné detekční prvky (fotonásobiče, 3)).

Podobně, existují další technicky náročné systémy, které však nachází uplatnění ve speciálních oblastech fluorescenčního měření.

5 Návrh a realizace systému pro vícekanálové měření

Cílem práce je navrhnout a realizovat metody současného měření tří fyziologických parametrů živých buněk – změny membránového napětí či měření akčního napětí, změny koncentrace vápníkových iontů a kontrakce srdeční buňky. Na základě současného stavu vědění se jako perspektivní jeví využití optických metod měření nebo kombinací kontaktních nebo semi-kontaktních metod, které poskytují specifické výhody oproti optickému měření a jsou pro konkrétní typ měření specializovány. Kapitola se tak zabývá přehledem navržených variant metod a popisem dvou realizovaných efektivních metod.

První krokem návrhu vhodné metody je volba vhodného spektrálního rozložení světla s ohledem na výběr metody měření jednotlivých parametrů a jejich vzájemných kombinací, a to i s ohledem na technické možnosti pracovního zařízení. V celém měřicím systému je k tomuto účelu potřeba:

- Zajistit současnou či střídavou excitaci jednotlivých barviv.
- Vymezit ve spektru viditelného světla rozsah vlnových délek jeden nebo dva fluorescenční kanály a průchozí světlo.
- Použít takové optické prvky, které dokážou dostatečně selektovat požadované pásmo vlnových délek a zamezit ovlivnění průchodem nežádoucích vlnových délek.
- Použít taková barviva, která mají dostatečně úzké emisní spektrum a co nejméně protáhlé boční laloky spektra tak, aby v co nejmenší míře ovlivňovaly přilehlá fluorescenční emisní pásma.
- Zajistit dostatečně široké spektrum průchozího světla, a to již v oblasti před průchodem objektivem tak, aby nedocházelo k ovlivnění fluorescenčních kanálů.
- Použít vhodný detektor pro každé spektrální pásmo, včetně potřebné synchronizace detektorů.

V případě, že jsou optické metody měření kombinovány s kontaktními či semi-kontaktními metodami, (příkladem může být zejména kombinace zejména s AFM systémem či mikroelektrodovým polem (MEA)), je nutné zajistit takové pozicování prvků (hrot AFM, velikost a tvar elektrod MEA), aby nedošlo k výraznému stínění a negativní ovlivnění optické metody měření. Tabulka znázorňuje přehled dostupných běžných prostředků a metod pro využití v současném a kombinovaném měření.

Tabulka 5.1 – Přehled optických metod a použitých barviv a kontaktních metod určených pro současné měření elektrofyzilogických parametrů na srdečních buňkách

Měření akčního napětí		Měření $[Ca^{2+}]_i$	Měření kontrakce	
Opticky	Kontaktně	Opticky	Opticky	Kontaktně
VSD skupiny ANEPPS	Patch-clamp	Indikátory skupiny Fluo	Mikroskopie ve světlém poli	AFM
VSD skupiny RH	MEA	FURA-2	Holografická mikroskopie	
VSD skupiny JPW		Indo-1	Fluorescenční mikroskopie	

5.1 Optické metody

Jednotlivé možné perspektivní varianty optických metod jsou shrnuty v Tabulka 5.2. Jedná se o užší výběr, ve kterém jsou zahrnuty nejpoužívanější prostředky. V jiném případě lze výběr rozšířit o řadu dalších možností.

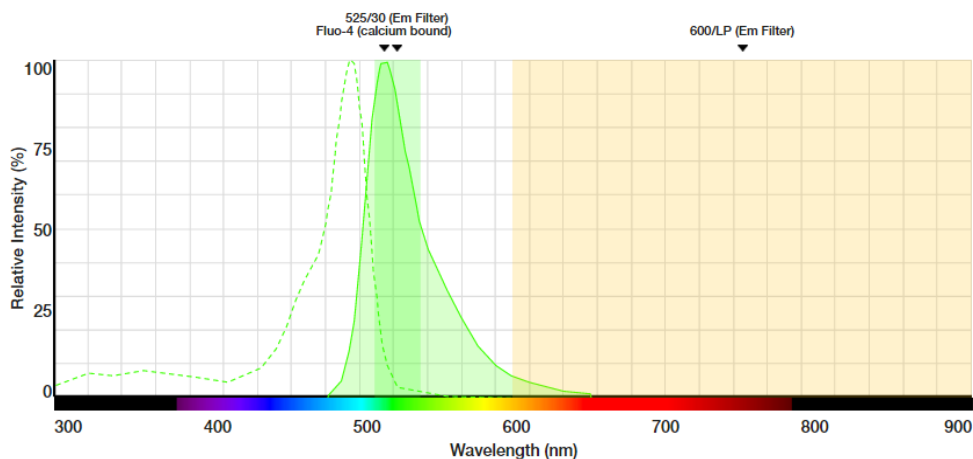
Tabulka 5.2 – Varianty kombinovaného měření s využitím optických metod a dostupných fluorescenčních barviv

Var.	Aplikace	Použité prvky	
		Zelený kanál	Červený kanál
A	Měření kontrakce a $[Ca^{2+}]_i$	Vápníkový indikátor skupina Fluo, FURA-2, Indo-1	Průchozí světlo (lampa mikroskopu)
B	Měření kontrakce a $[Ca^{2+}]_i$ (fluorescenční metoda)	Vápníkový indikátor skupina Fluo, FURA-2, Indo-1	Calcein (verze Red)
C	Poměrové měření AN	Napětově citlivé barvivo (2. spektrální oblast), skupina ANEPPS	Napětově citlivé barvivo (2. spektrální oblast), skupina ANEPPS
D	Nepoměrové měření AN a $[Ca^{2+}]_i$	Vápníkový indikátor skupina Fluo, FURA-2, Indo-1	napětově citlivé barvivo (s využitím 1 spektrální oblasti při posunu spektra), skupina ANEPPS, RH-237

V následující části jsou zobrazeny spektrální oblasti pro uvedené kombinace. K vytvoření spekter byl využit nástroj SpectraViewer (Thermofisher Scientific). Excitační spektra zobrazeny přerušovanou čarou, emisní spektra plno a jejich plocha je vyplněna barvou odpovídající spektrální křivce.

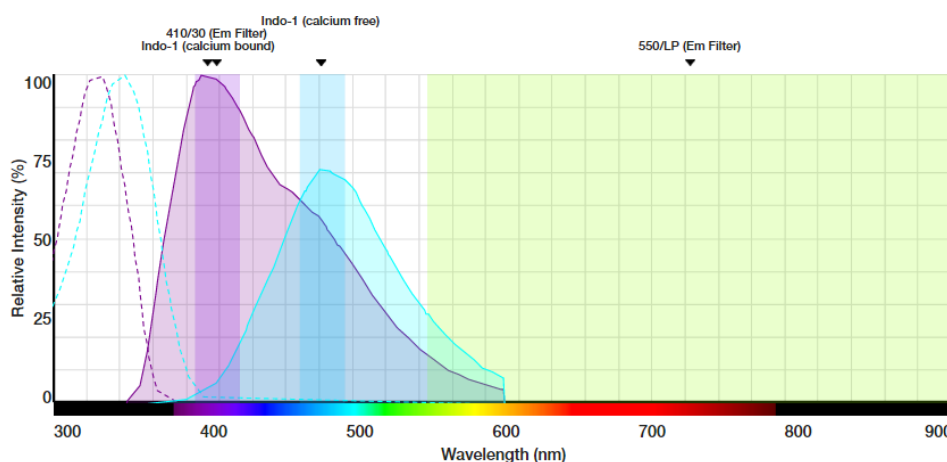
Variant A - Měření kontrakce a $[Ca^{2+}]_i$

Pro měření kontrakce je využita fluorescenční oblast dle použitého indikátoru a zbylá oblast v oranžové a červené části spektra je v co nejširším rozsahu možné využít pro průchozí světlo. Následující příklady uvedené na obrázcích Obrázek 5.1, Obrázek 5.3 a Obrázek 5.2 zobrazují varianty pro různé fluorescenční indikátory, se kterými je možné současné měření realizovat – postupně Fluo-4, Fura-2, Indo-1. Oblast pro průchozí světlo je vymezena optickým filtrem typu LP (horní propust), který propouští oblast od určité (ostré) hranice. V těchto případech jsou hranice na vlnových délkách 550 nm nebo 600 nm. Vzhledem k faktu, že průchozí světlo je utlumováno na kardiomyocytech na různých vlnových délkách v různé míře, je pro dosažení dostatečného kontrastu snímku nutné využít co nejširší oblast. Následující varianta s využitím indikátoru Fluo-4 anebo jiného indikátoru ze skupiny Fluo je technicky nejlépe proveditelná a pro aplikaci představenou v praktické části C je vhodnou variantou.



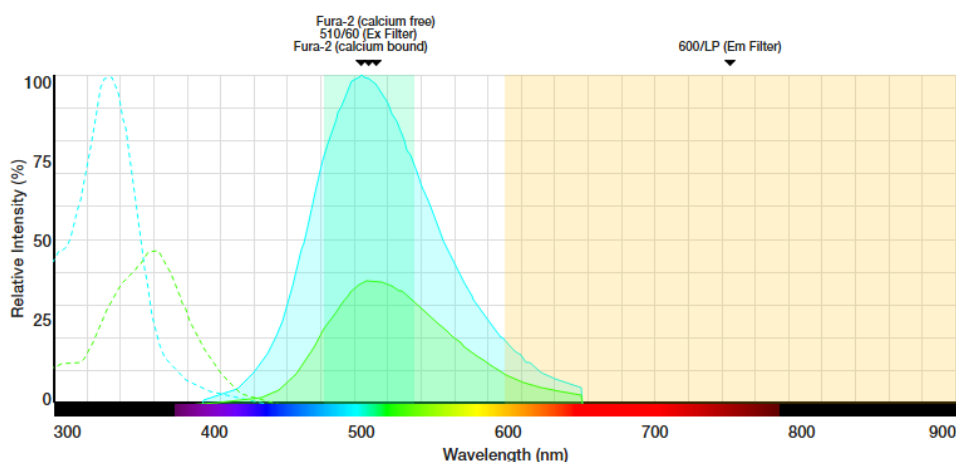
Obrázek 5.1– Spektrální oblast vlnových délek s vymezením oblastí pro současné měření Fluo-4 a zobrazení ve světlem poli.

Následující varianta s využitím Indo-1 není příliš vhodná, neboť je nutné využít celkem tři spektrální oblasti – dvě pro emisi fluorescence Indo-1 a třetí pro průchozí světlo. V tomto případě by bylo nutné využít celkem tři snímače anebo zajistit střídavé snímání. Vzhledem k pozici emisních spekter Indo-1 blíže k UV je možné rozšířit oblast pro průchozí světlo.



Obrázek 5.2 – Spektrální oblast vlnových délek s vymezením oblastí pro současné měření Indo-1 a zobrazení ve světlem poli.

Pro potřebu poměrového měření tak výhodnější variantu nabízí použití poměrového indikátoru Fura-2, kde je dostačující měření emise celkem ve dvou spektrálních oblastech a přepínání excitačních vlnových délek je možné ponechat na rychle přepínatelném zdroji UV světla.



Obrázek 5.3 – Spektrální oblast vlnových délek s vymezením oblastí pro současné měření Fura-2 a zobrazení ve světlem poli.

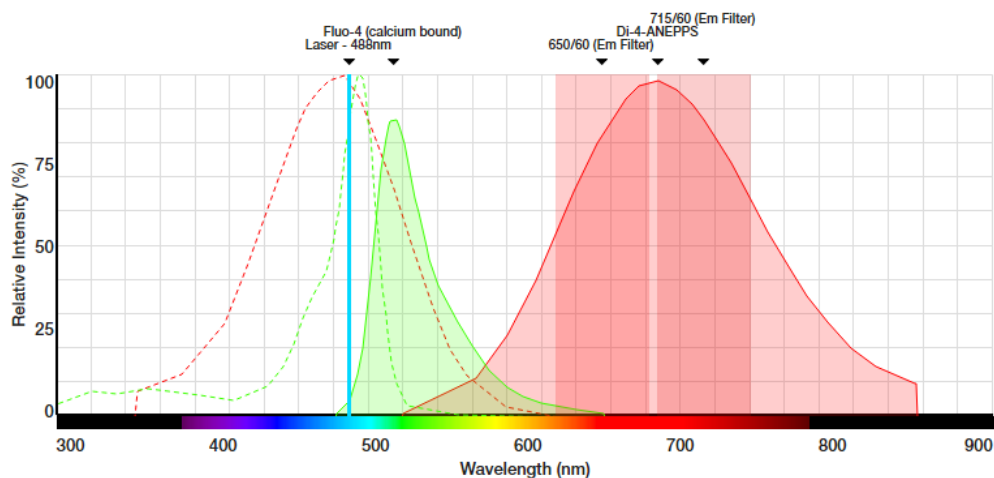
Varianta B - Měření kontrakce a $[Ca^{2+}]_i$ (fluorescenční metoda)

Tato metoda využívá druhé fluorescenční barvivo (v uvedeném případě Calcein Red) pro obarvení buňky a její zobrazení s mnohem výraznějším kontrastem než v případě průchozího světla. Tato vyvinutá varianta s využitím Calceinu (barvivo pro značení cytosolu) je blíže popsána v Praktické části C.

Varianta C - Poměrové měření AN

Poměrové měření s využitím napětově citlivého barviva vyžaduje vymezení dvou spektrálních oblastí, napravo a nalevo poblíž emisního maxima, kdy každá oblast reaguje na spektrální posuv směrem doprava. V jedné oblasti se projevuje úbytek jasu fluorescence (levá), zatímco ve druhé (pravá) intenzita jasu fluorescence roste. K tomuto účelu je nutné využít dva snímače anebo jeden snímač

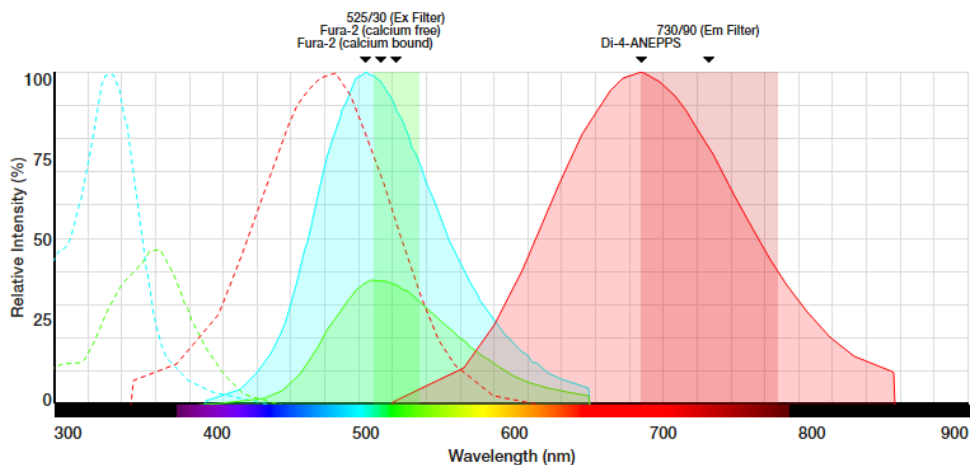
s optickou úpravou promítnutí obrazů z obou oblastí na tento snímač odděleně. Příklad vhodných dvou spektrálních oblastí je zobrazen v emisním spektru barviva Di-4-ANEPPS na Obrázek 5.4. V případě rozšíření o současné měření s využitím vápníkového indikátoru Fluo je potřeba navíc snímat emisi fluorescence v zelené oblasti spektra.



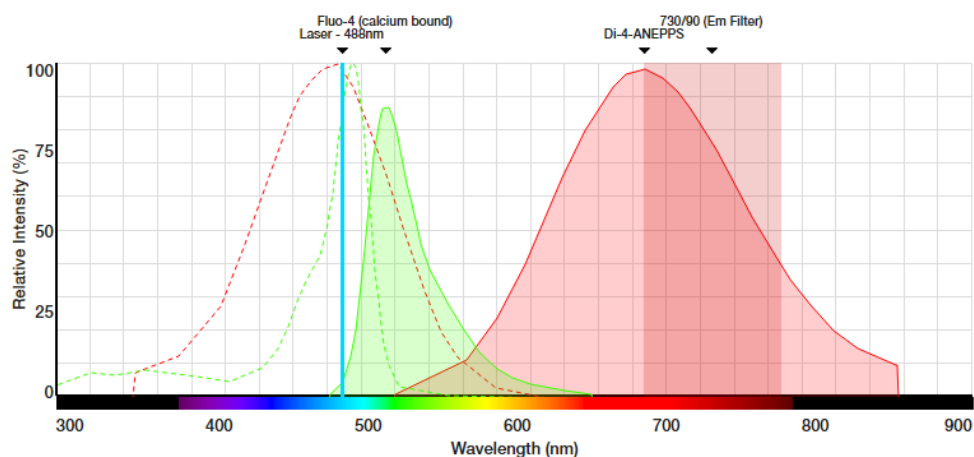
Obrázek 5.4 - Spektrální oblast vlnových délek s vymezením oblastí pro současné měření s Fluo-4 a Di-4-ANEPPS poměrovou metodou.

Varianta D - Nepoměrové měření AN a $[Ca^{2+}]_i$

Nepoměrové měření je vzhledem ke svým nevýhodám (absance možnosti eliminace pohybového artefaktu a dalších vlivů) používáno ojediněle. V následujících dvou příkladech na Obrázek 5.5 a Obrázek 5.6 je uvedena tato zjednodušená varianta pro současné měření s Fura-2 a Fluo-4.



Obrázek 5.5 - Spektrální oblast vlnových délek s vymezením oblastí pro současné měření s Fura-2 a Di-4-ANEPPS nepoměrovou metodou.

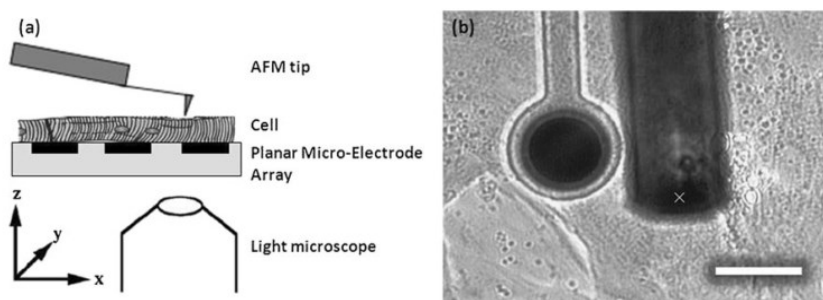


Obrázek 5.6 - Spektrální oblast vlnových délek s vymezením oblastí pro současné měření s Fluo-4 a Di-4-ANEPP nepoměrovou metodou.

Tato varianta je využívána např. v publikaci článku [135] uvádí studii spektrálních vlastností a možnosti použití kombinace barviv di-8-anepps a fura-2 na chuťových buňkách myši. Autoři dochází k závěru, že vzhledem k malému překryvu fluorescence ($<1\%$) z důvodu prostorově oddělené fluorescence Di-8-ANEPPS na membráně a Fura-2 v buněčné cytoplazmě je vhodné k aplikaci tohoto současného měření na různých chuťových buňkách u myši. Využívají metody poměrového měření v excitaci barvivem Fura-2, kdy provádí střídavou excitaci barviva Fura-2 na 340 a 360 nm a současně snímají fluorescenci Fura-2 a Di-8-ANEPPS ve dvou oddělených částech spektra bez překrytu. Výhodou je přímé měření $[Ca^{2+}]_i$.

5.2 Kombinace s kontaktními metodami

Jako užitečné se jeví navrhnout i systémy pro kombinované měření parametrů. Současně se měří např. koncentrace volného vápníku a mechanické funkce nebo koncentrace intracelulárního vápníku a akčního potenciálu.

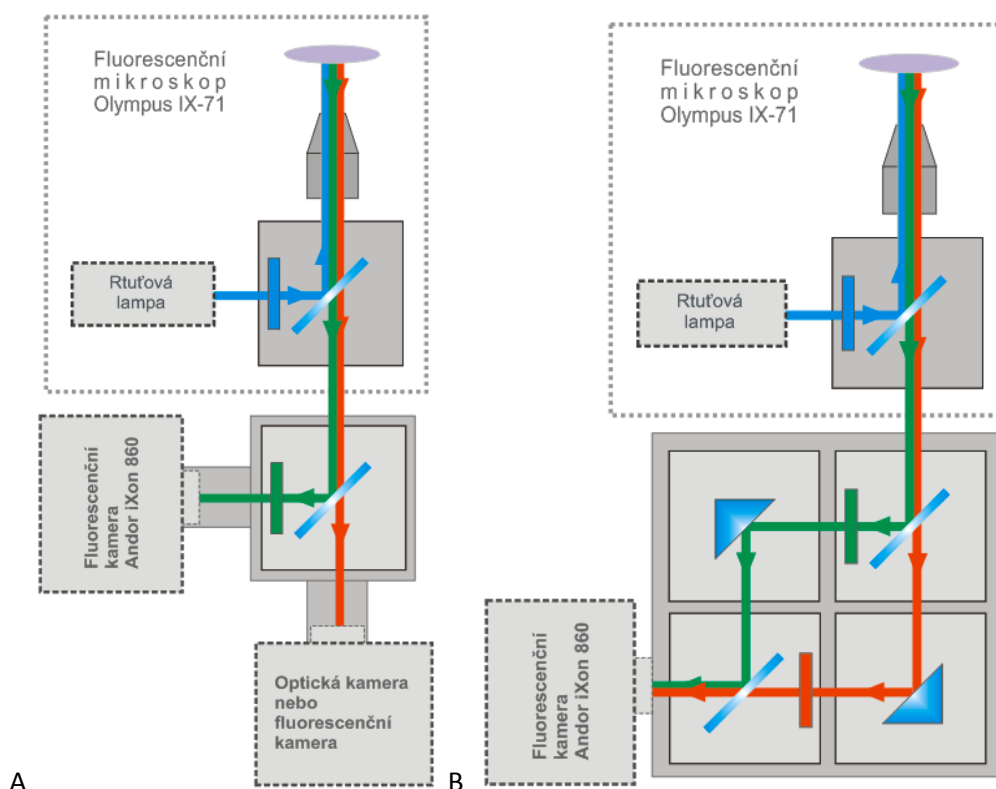


AFM se ukázala také výhodná pro simultánní měření více odlišných parametrů v rámci vazby excitace-kontrakce realizovaných odlišnou technikou – optickou mikroskopií, fluorescenční mikroskopií, anebo v případě elektrického měření s využitím pole elektrod (MEA) [136].

5.3 Návrh a realizace vícekanálového systému

Kapitola se zaměřuje na realizaci dvou odlišných typů optických adaptérů, u kterých je popsán návrh a realizace. Tyto optické adaptéry nachází uplatnění v experimentální části popsané v kapitole 9. Navržená zařízení umožňují současné nebo kombinované měření dvou až tří parametrů s využitím až dvou fluorescenčních kanálů a jednoho kanálu pro mikroskopii ve světlém poli – tedy jeden kanál je

uvažován pro průchozí světlo. Adaptéry jsou založeny na technických principech uvedených v kap. 4.4 (strana 42). Schéma zahrnující mikroskop a principiální schéma adaptérů připojených na výstupu mikroskopu je znázorněno na Obrázek 5.7.



Obrázek 5.7 – Schéma navržených optických adaptérů pro vícekanálové měření. A – optický rozbočovač pro dvě kamery, B – optický systém pro promítání spektrálně rozděleného obrazu vedle sebe na jeden čip kamery.

U obou adaptérů je uvažováno napojení na levý výstupní port mikroskopu IX-71 s fokusací. Z tohoto důvodu není nutné zařazení optických čoček zajišťující kolimaci a fokusaci, a proto nejsou v návrhu a také ve fyzické realizaci přítomny. V tomto případě však byl minimalizován rozměr adaptérů, aby bylo možné tento port použít. Své užití tyto adaptéry nachází v aplikacích uvedených v Tabulka 5.3:

Tabulka 5.3 – Seznam využití realizovaných optických adaptérů. Pozn. AN – akční napětí na membráně kardiomyocytu.

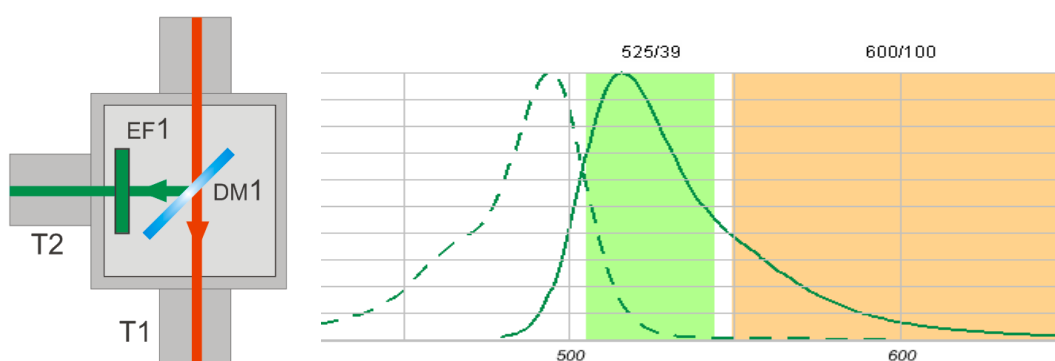
Číslo	Aplikace	Spektrální oblast		Adaptér A (2 kamery)	Adaptér B (1 kamera)
		Zelený kanál	Červený kanál		
1)	Měření kontrakce a $[Ca^{2+}]_i$	Vápníkový indikátor	Průchozí světlo	ANO	ANO
2)	Měření kontrakce a $[Ca^{2+}]_i$ (fluorescenční metoda)	Vápníkový indikátor	Calcein (verze Red)	ANO	S OBTÍŽEMI
3)	Poměrové měření AN	Napětově citlivé barvivo (1. spektrální oblast)	Napětově citlivé barvivo (2. spektrální oblast)	ANO	ANO
4)	Nepoměrové měření AN a $[Ca^{2+}]_i$	Vápníkový indikátor	Napětově citlivé barvivo	ANO	NE

5.3.1 Optický rozbočovač s využitím dvou kamer

Intenzita jasu průchozího světla je mnohonásobně větší než intenzita jasu fluorescence, může to být řádově 100 x až 1000 x. Pro úspěšnou praktickou realizaci je proto potřeba vhodnou kombinací dichroického zrcadla MD1, MD2 a emisního filtru EM1 dosáhnout co největší propustnosti v oblasti průchozího světla a přitom klást důraz na zamezení průchodu nechtěných vlnových délek v oblasti

měřené fluorescence barviva Fluo-4 v rozsahu 500 - 550 nm. Zrcadlo DM1 (dichromatické zrcadlo v optickém adaptéru) a DM2 (optické zrcadlo zařazené ve fluorescenční kostce mikroskopu) musí mít co největší propustnost v oblasti propustných vlnových délek a naopak co nejmenší odrazivost pro tuto oblast. Jakékoli parazitní světlo, ať už průchozí, nebo excitační, které se mohou dostat na snímač kamery kolmé k optické cestě, pak dodatečně filtruje emisní filtr EF1. Ten musí v pásmu kolem 520 nm (max. emisní vlnová délka Fluo-4) vykazovat co největší propustnost, a to v co největší šířce pásma. Vhodné pásma propustnosti pro fluorescenční emisi a průchozí světlo jsou spolu se spektry Fluo-4 uvedeny na Obrázek 5.8.

Proto byl zvolen takový emisní pásmový filtr, který vykazuje vysokou propustnost požadovaného pásma a současně velký útlum v oblasti nežádaných vlnových délek oproti standardním optickým barevným filtrům. Pro průchozí světlo je vybráno dostatečně široké pásmo vlnových délek, a to z praktických důvodů. Různé vlnové délky se na membráně a intracelulárních komponentách buňky utlumují různě. Zúžením spektrálního pásma dochází ke snížení kontrastu v obraze buňky. Na následujícím obrázku (Obrázek 5.8) je uvedeno schéma adaptéru s vyznačenými prvky.



Obrázek 5.8 – Vlevo je zobrazen návrh adaptéru pro rozbočení optické cesty ke dvěma kamerám, vpravo je vyobrazena spektrální oblast ve viditelné oblasti světla se spektry Fluo-4. Zelenou a oranžovou barvou jsou vyznačeny rozsahy spekter pro optimální propustnost fluorescence i průchozího světla. Na vodorovné vlnových délek jsou vyznačeny významné vlnové délky (v nm), svislá osa značí relativní intenzitu fluorescence.

Požadavek je možné realizovat volbou dichromatického zrcadla DM2 s širokým propustným pásmem pro průchozí světlo, ideálně jako horní propust s maximální propustností v této oblasti a s hranicí blízké maximální vlnové délce propustného pásma fluorescenčního kanálu v našem případě s hodnotou 534,5 nm.

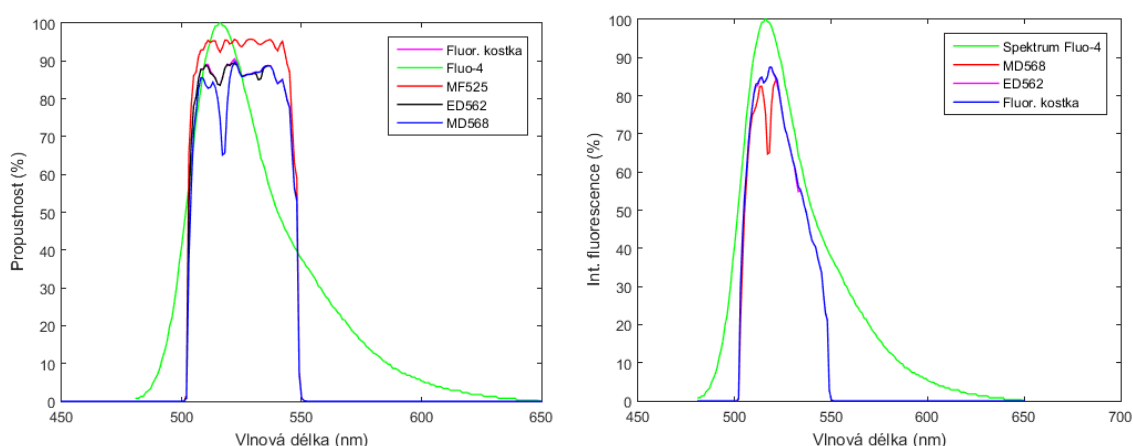
Tabulka 5.4 – Tabulka použitých optických prvků při návrhu a realizaci optického rozbočovače

Označ.	Výrobce a model	Typ	Odrasné pásmo (nm)	Propustné pásmo (nm)	Pozice
MD498	Thorlabs MD498	Dichromatické zrcadlo	452 - 490	505 – 800	Fluor. kostka
DM562	Edmund Optics TECHSPEC	Dichromatické zrcadlo	490 - 554	570 – 750	Opt. adaptér
MD568	Thorlabs MD568	Dichromatické zrcadlo	525-556	580 – 650	Opt. adaptér
MF525	Thorlabs MF525	Emisní filtr	není	506 – 545	Opt. adaptér
MF630	Thorlabs			596 – 665	Mikroskop

Z výše popsanych důvodů byla pro konkrétní realizaci zvolena tato sestava filtrů:

- Dichroické zrcadlo DM1 – Thorlabs DM498.
- Dichroické zrcadlo DM2 – Thorlabs DM568.
- Emisní filtr EM2 – Thorlabs MF525-39.
- Emisní filtr EM1 – Olympus BA590.

Pro ověření přesné propustnosti jednotlivých kanálů byly charakteristiky optických prvků vymodelovány v prostředí Matlab. Charakteristiky filtrů Thorlabs, Olympus a Edmund Optics byly získány v digitální formě s krokem 0.1 nm od výrobců. Spektrum světla halogenové lampy mikroskopu bylo změřeno spektrometrem Ocean Optics USB 2000+. Aby bylo možné prvky vymodelovat společně, byla provedena příslušná interpolace.



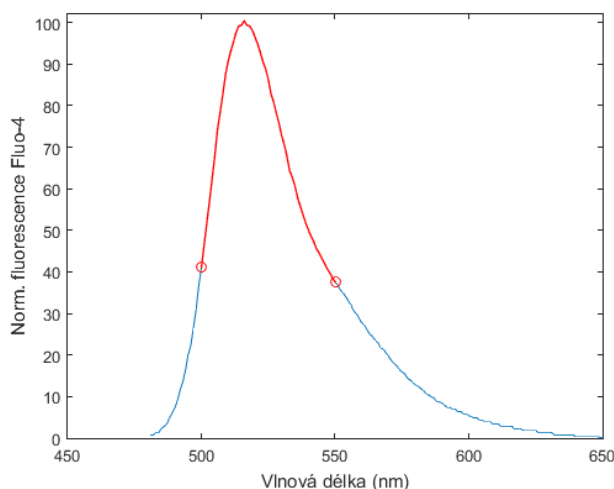
Obrázek 5.9. Srovnání průchodnosti fluorescence Fluo-4 fluorescenční kostkou bez využití a s využitím přidavných dichromatických zrcadel.

První analýza, jejíž výsledek je zobrazen na Obrázek 5.9, slouží k výběru vhodného dichromatického zrcadla do pozice MD2 v optickém adaptéru. Na Obrázek 5.9 je zobrazeno emisní spektrum vápníkového indikátoru Fluo-4. Další křivky vyjadřují srovnání v případě standardního měření s využitím fluorescenční kostky pro Fluo-4 a změnu průchodnosti světla v oblasti emise v případě využití přidavných filtrů:

- MF525 – průchodnost emisního filtru MF525,
- fluorescenční kostka – průchodnost ve standardním případě, pokud je v optické cestě zařazena pouze fluorescenční kostka (sestava filtrů MD498 a MF525),
- ED562 – průchodnost v případě, že je v optickém adaptéru zařazeno dichromatické zrcadlo Edmund Optics ED562,
- alternativní možnost, kdy je v optickém adaptéru zařazeno dichromatické zrcadlo MD568.

Samotný emisní filtr sníží emisi fluorescence v maximálním propustném pásmu o zhruba 6 %, další pokles způsobí průchod přes dichromatické zrcadlo umístěné ve fluorescenční kostce, a to zhruba o 11 %. Dichromatické zrcadlo ED562 vykazuje výborné vlastnosti, a tak je v případě použití tohoto prvku změna průchodnosti zanedbatelná. Zato MD568 obsahuje lokální snížení průchodnosti na vlnové délce 516 nm a v blízkém okolí. Přesné charakteristiky filtrů byly obdrženy od výrobců filtrů. Z dostupných dat byla vypočítána skutečná propustnost v oblasti vlnových délek 500 – 550 nm. Rozsah vlnových délek je zobrazen na křivce emisního spektra Fluo-4 (Obrázek 5.10 A) a propustnost je vyjádřena kvantitativně v tabulce (Obrázek 5.10 B). V tabulce je vyjádřena procentuální průchodnost optické

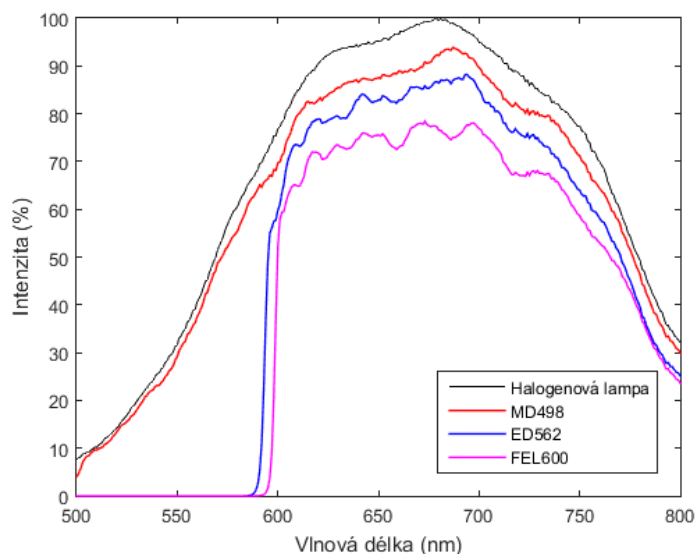
sestavy v pásmu 500 - 550 nm jako Průchodnost 1, následně procentuální poměr průchodnosti optické sestavy ve srovnání s optickou kostkou.



Název filtru	Pozice	Průchodnost 1 (%)
Fluor. kostka	IX-71	82,69
MD568	IX-71	78,67
ED562	IX-71	82,40
Název filtru	Pozice	Průchodnost 2 (%)
MD568	DM1	95,14
ED562	DM1	99,66

Obrázek 5.10 - Rozsah analyzované oblasti spektra fluorescenčního barviva Fluo-4 (vlevo), výsledky analýzy propustnosti (vpravo) s využitím různých optických prvků. V pravé části jsou uvedeny pozice prvků, buď se nachází ve fluorescenční kostce mikroskopu IX-71, anebo se jedná o prvky v optickém adaptéru odpovídající schématu na Obrázek 5.8.

Na Obrázek 5.11 je zobrazeno širokopásmové spektrum halogenové lampy a změna intenzity světla po průchodu DM2 v adaptéru a následně i po průchodu přes EF1 (Thorlabs MF630-69).



Obrázek 5.11 – Spektrum v oblasti průchozího světla. Světlo halogenové lampy a snížení její relativní intenzity průchodem přes dichromatické zrcadlo a optické filtry při průchodu systémem.

Průchozí větví směrem ke snímáči projde 71 % původní intenzity světla halogenové lampy (spočteno v pásmu 550 – 700 nm). Podstatné je, aby přes MD2 došlo k odrazu co nejmenší množství průchozího světla. Zde je potřeba brát v potaz, že intenzita průchozího světla může mít intenzitu až 1000x vyšší než emitovaná fluorescence. Výpočtem byla získána pouze hodnota $4,83 \cdot 10^{-07}$ % původní intenzity v intervalu 500 – 550 nm. Světlo je dále ještě filtrováno emisním filtrem EF1. Průchozí světlo, které je

schopno se dostat na snímač umístěné v přímé cestě, je lze vzhledem k jeho nízké hodnotě považovat za zanedbatelné.

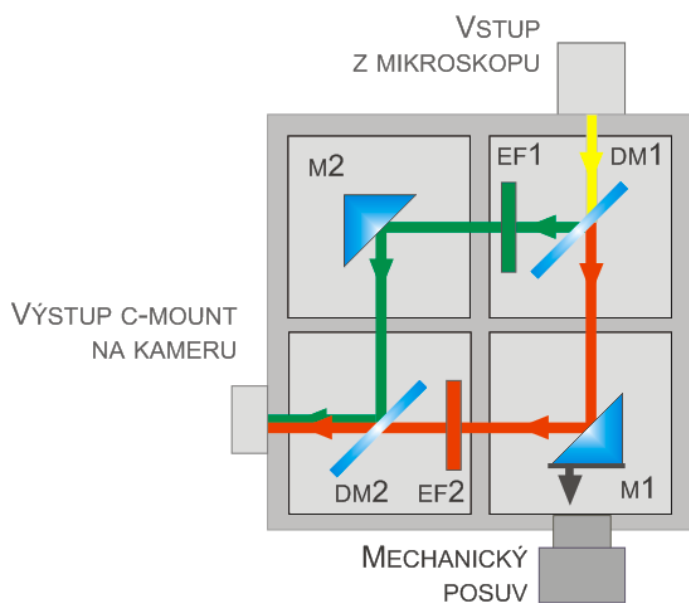


Obrázek 5.12. Realizace optického rozbočovače. S kamerou Andor iXon a Olympus i-Speed 3 vlevo, s dvojicí kamer Andor iXon vpravo.

Při realizaci je zajištěno možnost změny délky T1 a T2 (Obrázek 5.8 vlevo) spojující fluorescenční kostku a kamery pro případ, že jsou použity kamery se s odlišnou vzdáleností čipu od vstupu C-mount/F-mount nebo je potřeba provést obdobnou korekci. Tato změna délky tubusů je využita také v metodě manuálního přeastření před kamerou za účelem získání kontrastnějšího snímku. Postup je blíže uveden v Praktické části C.

5.3.2 Praktická realizace – optický systém promítání obrazů na jeden snímač

Zařízení je určeno pro současné měření s využitím dvou fluorescenčních kanálů – červeného a zeleného. Zařízení vychází z principů uvedených v kapitole 4.5. Zařízení je umístěno na levý dolní výstupní port mikroskopu, který je fokusovaný. Optickou cestu není potřeba prodlužovat, na vstupu a výstupu zařízení proto nejsou zařazeny čočky pro prodloužení svazku a jeho následnou fokusaci na výstupu.



Obrázek 5.13 – Schéma adaptéru pro spektrální rozdělení obrazu a promítnutí dvou oddělených obrazů na jeden čip kamery.

Zařízení obsahuje první dichroické zrcadlo (DM1), které rozděluje celé spektrum na červený a zelený kanál. V obou kanálech dále dochází k výběru vhodného pásma vlnových délek pomocí emisních filtrů (EF1, EF2). Odraznými zrcadly (M1, M2) jsou světelné svazky přivedeny na druhé dichroické zrcadlo DM2, jehož funkcí je nasměrovat oba svazky do rovnoběžné pozice na čip snímacího zařízení. Optické prvky jsou prakticky uloženy ve čtyřech oddělených optických kostkách umístěných přesně ve čtvercové pozici pevně ve schránce. Aby bylo možné oba kanály od sebe na čipu snímacího zařízení prostorově oddělit, obsahuje pravá dolní optická kostka vychýlení od své středové pozice. Vychýlení je realizováno mikroposuvem, který umožňuje její plynulý pohyb ve vertikálním směru (v řezu), tím je dosaženo posuvu obrazu červeného kanálu od obrazu zeleného kanálu na čipu kamery. Vzhledem k velikosti čipu kamery Andor iXon 860 (3,5 mm) je proto zajištěn posuv s velice jemným měřítkem. V zařízení jsou použita dvě shodná dichromatická zrcadla, výstup zařízení je proto kolmý na vstup. Optické prvky jsou umístěny v magneticky uchycených kostkách, které lze snadno a rychle vyměnit anebo měnit jejich pozici.

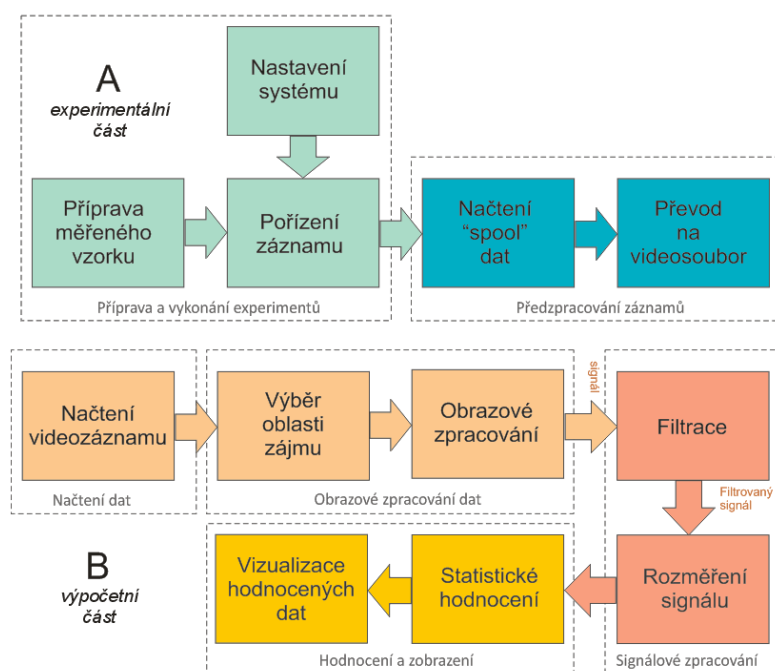
Ukázka realizovaného optického adaptéru s portem pro připojení k mikroskopu na straně jedné a s úchytem C-mount pro kameru na straně druhé. Na fotografiích je adaptér bez krytu, při použití je využit plechový černý kryt pro zastínění optických prvků od vnějšího světla. K řízení posuvu jednoho ze zrcadel slouží otočný prvek s měřítkem. Ten umožňuje jemný posun zrcadla ve svislé ose.



Obrázek 5.14 – Ukázka realizovaného optického adaptéru s portem pro připojení k mikroskopu na straně jedné a s úchytem C-mount pro kameru na straně druhé. Na fotografiích je adaptér bez krytu, při použití je využit plechový černý kryt pro zastínění optických prvků od vnějšího světla. K řízení posuvu jednoho ze zrcadel slouží otočný prvek s měřítkem (detailněji je ozobrazeno na pravém snímku). Držák fluorescenčních kostek je umístěn na nastavitelném podstavci. Ten umožňuje jemný posun zrcadla ve svislé ose.

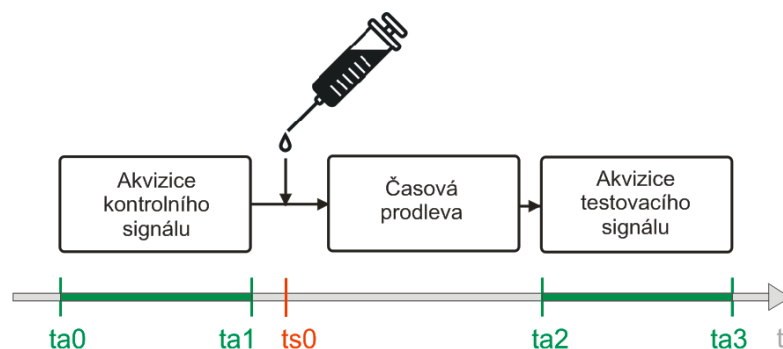
6 Hodnocení získaných dat

Celý proces měření, zpracování a hodnocení dat použitý standardně v práci, resp. v praktické části A – C, s využitím optických metod lze shrnout v následujícím schématu uvedeném na *Obrázek 6.1*. Experimenty předvedené v této práci lze rozdělit na dvě skupiny. První skupina zahrnuje experimenty zaměřené na měření elektromechanických vlastností shluků iPSC kardiomyocytů v kombinaci světelné mikroskopie a mikroskopie atomárních sil, dále také společně s optickým měřením vápníkových transientů. Druhá se zaměřuje na návrh optických metod měření elektrofyziologických parametrů jednotlivých izolovaných kardiomyocytů s využitím fluorescenční mikroskopie a světelné mikroskopie s pozorováním ve světlém poli. Každá část sestává ze sestavení experimentálního zařízení, přípravy a realizace experimentů a následného zpracování a hodnocení dat.



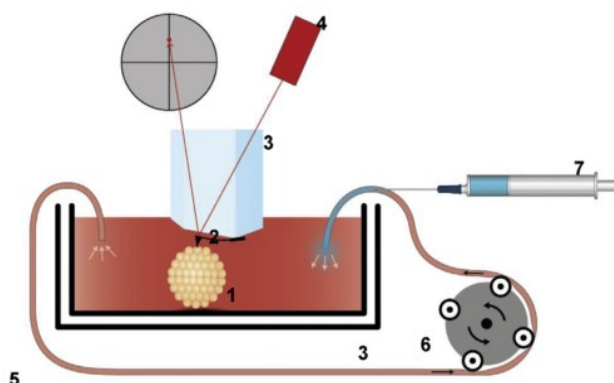
Obrázek 6.1 - Schéma experimentální (A) a výpočetní (B) části. Schéma zahrnuje obecný použitý postup od přípravy vzorku po hodnocení získaných signálů.

Schéma sestává ze dvou částí: A – experimentální část, B – výpočetní část, část realizovaná na výpočetním zařízení. První praktická část se zabývá aplikační sférou. Aplikační část zajišťuje ověření vlivu testované látky na funkční parametry pozorovaného vzorku. V podstatě lze experimenty, kde byla aplikována látka, která ovlivnila měřené parametry, rozdělit na dvě odlišné skupiny. Tyto skupiny se liší způsobem akvizice a hodnocení získaných dat. První skupina zahrnuje statistické hodnocení vlivu testované látky. Schéma takového experimentu vyjadřuje *Obrázek 6.2*.



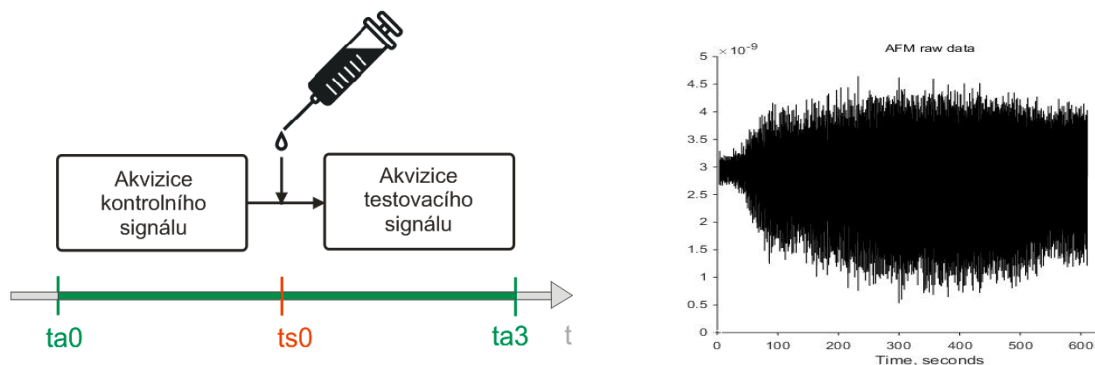
Obrázek 6.2 – Varianta experimentů, kde je nejdříve pořízen kontrolní signál a následně po aplikaci testované látky po ustálení (a vhodné časové prodlevě) pořízen signál za stejných podmínek s aplikovanou testovanou látkou.

V tomto případě je nejdříve pořízen kontrolní signál s délkou $ta1 - ta0$ (dle Obrázek 6.2). Následně je vhodným způsobem do vzorku vpravena látka, jejíž vliv je testován. Postupné vstřebávání látky – její nástup – probíhá v pauze ($ta2 - ta1$), která mezi akvizicí kontrolního a testovaného signálu nastává. Poté je pořízen nový záznam o délce $ta3 - ta2$, která obvykle odpovídá délce prvního získaného záznamu nebo naopak svou délkou první záznam přesahuje. Výstupem jsou celkem dva záznamy – kontrolní signál a signál získaný po aplikaci testované látky, které jsou hodnoceny. K tomuto účelu slouží sestava uvedená na obrázku Obrázek 6.3. Sledovaný objekt /1/ je umístěn v misce s médiem, které umožňuje jeho funkce (Tyrodův roztok). Médium je postupně přečerpáváno pomocí peristaltického čerpadla za médium nové, do kterého je přidána aplikovaná látka stříčkou. Nástup účinnosti aplikované látky nastává postupně s výměnou média a vstřebáním látky měřeným objektem.



Obrázek 6.3 – Aplikace testované látky. 1 – Měřený objekt, 2 – Držák s hrotem u AFM modulu, 3 – AFM zařízení, 4 – Laserový zdroj pro AFM, 5 – Přívodní a odvodní hadička pro médium, 6 – Peristaltická pumpa napojená na hadičku, 7 – Stříčka s testovanou látkou.

V druhém případě probíhá akvizice průběžně od okamžiku $ta0$ do okamžiku $ta3$. Získaný signál je tak většinou mnohem rozsáhlejší a zahrnuje v sobě postupnou změnu, kterou způsobuje aplikovaná látka, s tím, že je vhodná znát okamžik $ts0$. Tento způsob je realizován s pomocí rychlého perfuzního systému anebo rychlým manuálním vpravením aplikované látky přímo na měřený vzorek pomocí stříčky lokálně.



Obrázek 6.4 - Varianta experimentů, kde je nejdříve pořizován kontrolní signál a při neustále probíhající akvizici proběhne vhodnou formou (např. s využitím rychlého perfuzního systému) výměna roztoku anebo vpravení testované látky lokálně a dojde k ovlivnění fyziologických parametrů měřeného objektu. Nárůst změn je také zaznamenán a hodnocen.

V experimentální části A byl použitou látkou kofein, u kterého je u EB sledován vliv na získané funkční parametry. Kofein je často využíván pro rychlé řízené zvýšení koncentrace vápníkových iontů v cytosolu [137]. V mnoha případech dočasně vykazuje opačný efekt. Vykazuje vliv také na řadu dalších parametrů v rámci signalizace a mechanické funkce iPSC-CM. Tento vliv byl otestován.

6.1 Hodnocení signálů

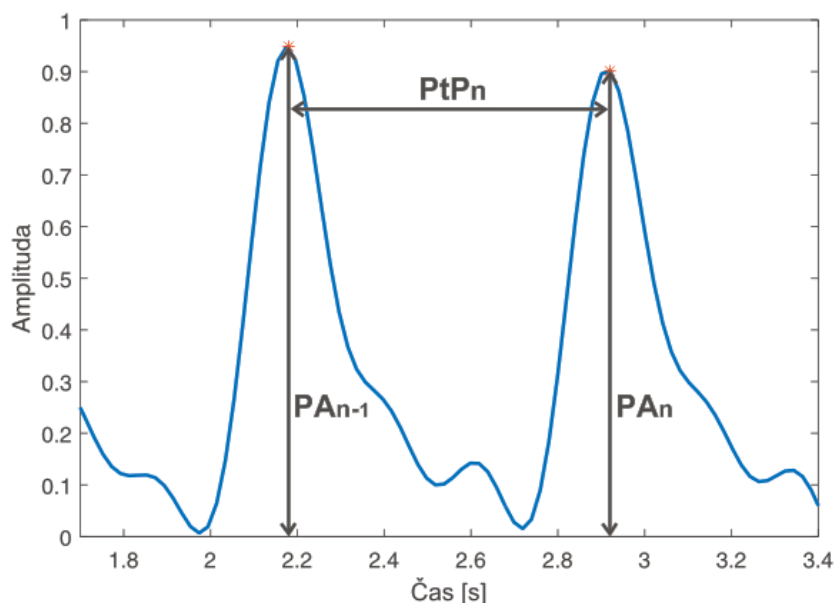
Získané signály jsou analyzovány. Rozměřením signálů jsou získány (časové) funkční parametry odpovídající jednotlivým fázím kontrakce anebo vápníkové signalizace. Hodnoty získaných parametrů jsou hodnoceny statisticky a výsledky jsou v mnoha případech také graficky vizualizovány za účelem názornosti anebo usnadnění hodnocení v provedené diskusi. Statistické zpracování probíhá za účelem porovnání funkčních parametrů měřeného vzorku pro dva hlavní účely:

- A. porovnání úspěšnosti filtrace a vlivu jednotlivých filtrací na analýzu a hodnocení signálu,
- B. a ověření aplikační části vlivu kofeinu na jednotlivé funkční parametry.

V obou případech je hodnocen

- a. vliv na frekvenční spektrum špiček,
- b. vliv na spektrum maximálních hodnot špiček,
- c. vliv na rozměřené časové parametry signálu.

V prvním případě jsou srovnány hodnocené parametry (nalezené intervaly mezi špičkami) u signálu, který neprošel filtrací, který lze nazvat tzv. kontrolním signálem, a signály, které jsou výstupem po zpracování třemi odlišnými typy filtrací. V druhém případě je srovnán signál získaný po aplikaci kofeinu na měřený vzorek se signálem kontrolním. Výstupy jsou pak tabulkově i graficky srovnány a komentovány. Pro body *a* a *b* jsou definovány pojmy frekvenční spektrum špiček a spektrum maximálních hodnot špiček. Pojmy vysvětluje Obrázek 6.5.



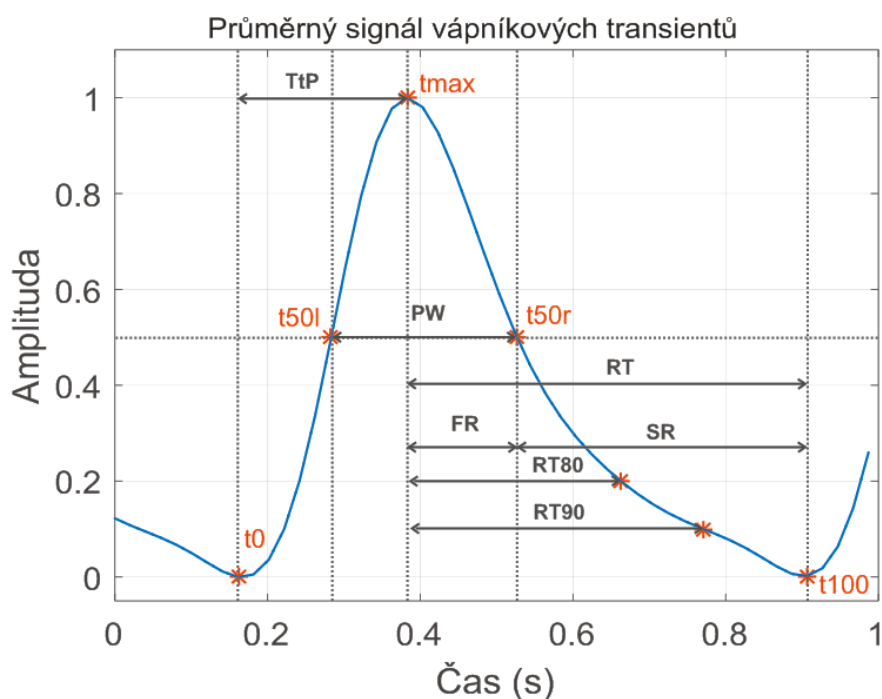
Obrázek 6.5 – Dva po sobě následující cykly (obecný n a $n-1$ cyklus) vápníkových transientů po filtraci metodou EEMD. V obrázku jsou vyznačeny pojmy PtP a PA jako časová vzdálenost mezi špičkami (mezi maximy cyklů) a jejich amplituda.

Maximální hodnota špičky PAn je hodnota amplitudy v pozici lokálního maxima cyklu vápníkového transientu anebo kontrakčního cyklu. Tyto hodnoty jsou na Obrázek 6.5 vyznačeny ve dvou místech u dvou cyklů vápníkových transientů, kde byly nalezeny detekované body maxima signálu. Obdobně je na Obrázek 6.5 zobrazen rozsah PtP . Jedná se o čas mezi dvěma nalezenými maximy (dvou cykly po sobě jdoucích), jedná se o časovou hodnotu.

U analyzovaného signálu je v celé sekvenci N cyklů vápníkových transientů a obdobně N kontrakčních cyklů je detekována sekvence špiček, ze kterých je získána skupina hodnot PA_1 až PA_N a ze dvojic vždy následujících špiček skupina PtP_1 až PtP_N . Ty jsou uloženy ve vektorech PA a PtP a jsou s nimi prováděny další operace. Ostatní parametry jsou nazývány jako funkční. Tyto *funkční parametry* jsou časové parametry a mají úzkou souvislost s procesy či ději vyjádřenými signály vápníkových transientů či signály kontrakce. Jsou definovány v následující kapitole (0).

6.2 Hodnocené parametry

Při analýze signálů vápníkových transientů je nejdříve nutné v celém signálu pro jednotlivé vápníkové cykly lokalizovat (detekovat) stěžejní body, ze kterých jsou dále dopočteny jednotlivé funkční parametry signálu. Na Obrázek 6.6 je zobrazen průměrovaný signál vápníkových transientů získaný v Praktické části A, na kterém jsou vyznačeny stěžejní body pro rozměření a funkční parametry vycházejících ze vzdáleností mezi těmito body.



Obrázek 6.6 – Průměrovaný signál vápníkových transientů získaný v Praktické části A, na kterém jsou vyznačeny detekované stěžejní body pro rozměření a funkční parametry vycházejících ze vzdáleností mezi těmito body.

Jedná se o tyto body:

t_0 – (časový) počátek cyklu s nulovou amplitudou, který předchází nárůstu koncentrace intracelulárního vápníku způsobeným vyplavením vápníku ze sarkoplasmatického retikula. Před tímto bodem se nachází alespoň krátká pauza v signálu s úrovní hodnot na minimální hodnotě.

t_{max} – okamžik, kdy je dosaženo maximální hodnoty signálu v jednom cyklu, tj. špičky signálu. V tomto okamžiku dochází k dosažení maximální koncentrace intracelulárního vápníku v buňkách.

t_{50} , t_{80} a t_{90} – okamžiky, ve kterých dojde k poklesu signálu od maximální hodnoty na úroveň 50 %, 20 % a 10 % maximální hodnoty A_{max} . Tyto body se nachází mezi t_{max} aktuálního cyklu a t_0 následujícího cyklu.

Ze znalosti těchto bodů jsou určeny hodnocené funkční parametry odpovídající parametrům získaným rozměření signálů uvedených v kap. 1.3 na Obrázek 1.7 a Obrázek 1.8:

TtP (time-to-peak) – doba, za kterou je v aktuálním cyklu signálu dosaženo maximální hodnoty, tu lze vyjádřit jako

$$TtP = t_{max} - t_0 \quad 2$$

FR (fast relaxation) – doba, za kterou dojde k poklesu signálu z jeho maximální hodnoty na poloviční amplitudu. Lze ji vyjádřit jako

$$FR = t_{50} - t_{max} \quad 3$$

SR (slow relaxation) – doba, za kterou dojde k poklesu signálu z jeho maximální hodnoty na minimální hodnotu v úseku mezi t_{max} současného cyklu a t_{100} . Tato hodnota velmi často odpovídá hodnotě (a pozici) t_0 následujícího cyklu.

$$SR = t_{100} - t_{50} \quad 4$$

SA – maximální hodnota signálu v cyklu, která se nachází v okamžiku t_{max} .

RT (recovery time) – doba, za kterou dojde ke vstřebání vápníkových iontů po jejich vyplavení.

$$RT = t_{100} - t_{max} \quad 5$$

PtP (peak-to-peak-time) – doba, která uběhne mezi dosažením maximálních hodnot ve dvou po sobě následujících cyklech $n-1$ a n , tj. časová vzdálenost mezi dvěma po sobě následujícími špičkami.

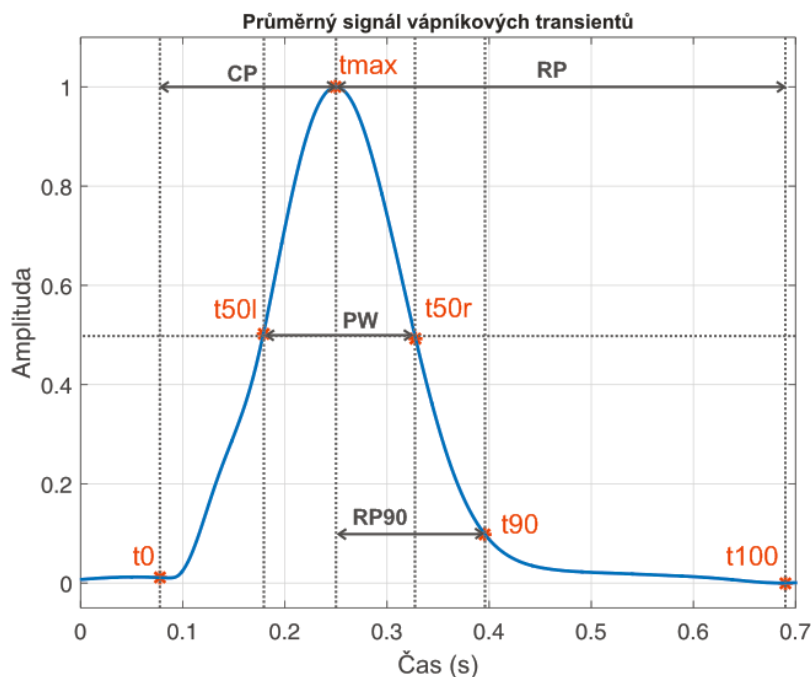
$$PtP_n = t_{maxn-1} - t_{maxn} \quad 6$$

FP (frekvence dvojice špiček) - Hodnota PtP odpovídá periodě špiček. Proto lze frekvenci vypočítat jako

$$FP_n = 1/PtP_n \quad 7$$

PW (odpovídá FWHM, tj. full width in half maximum) – tento parametr je šířkou špičky, lze jej vypočítat ze znalosti hodnot v t_{50l} a t_{50r} jako

$$PW = t_{50l} - t_{50r} \quad 8$$



Obrázek 6.7 - Průměrovaný signál kontrakce získaný v Praktické části A, na kterém jsou vyznačeny detekované stěžejní body pro rozměření a funkční parametry vycházejících ze vzdáleností mezi těmito body.

Jeden cyklus signálu lze oddělit počátečním bodem t_{0n-1} a koncovým bodem t_{100n-1} , který je u vápníkových signálů současně počátečním bodem v dalším cyklu t_{0n} . U signálů kontrakce téměř vždy nastává odstup t_{100n-1} a t_{0n} . Vzdálenosti jsou blíže vysvětleny na základně provedených analýz v následující kapitole (Kap. 7, Tabulka 7.2). Výsledně je získána sada detekovaných bodů a sada dopočtených parametrů pro každý cyklus analyzovaného signálu. V seznamu hodnocených funkčních parametrů kontrakce ještě figuruje parametr **CP**, který plně odpovídá parametru *TtP* u vápníkových transientů. Ten vyjadřuje kontrakční fázi (*contraction phase*) u kontrakčního signálu. Mimoto jsou zde i další dva parametry:

CP (*contraction phase*) – doba, za kterou je v aktuálním cyklu signálu dosaženo maximální hodnoty.

$$CP = t_{max} - t_0 \quad 9$$

RP (*recovery phase*) – doba, za kterou dojde k poklesu z maximální hodnoty cyklu na hodnotu minimální.

$$RP = t_{100} - t_{max} \quad 10$$

RP90 (*recovery phase (90 %)*) – doba, za kterou dojde k poklesu z maximální hodnoty cyklu na 90% hodnoty minima. 90 % fáze vypovídá o bodu, kde končí zhruba lineární pokles a následuje rychlý pokles ve fázi RP.

$$RP90 = t_{90} - t_{max} \quad 11$$

Rozměření a dopočtením dle výše uvedených vztahů je získána sada (matice) funkčních parametrů pro celou délku signálu o počtu N vápníkových cyklů (Obrázek 6.8) a v počtu N kontraktilních cyklů (Obrázek 6.9).

Délka signálu (1...N cyklů) →	TtP ₁	FR ₁	SR ₁	RT ₁	RT80 ₁	RT90 ₁	PtP ₁	FP ₁	PW ₁	PA ₁
	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
	TtP ₄	FR ₄	SR ₄	RT ₄	RT80 ₄	RT90 ₄	PtP ₄	FP ₄	PW ₄	PA ₄
	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
	TtP _{N-1}	FR _{N-1}	SR _{N-1}	RT _{N-1}	RT80 _{N-1}	RT90 _{N-1}	PtP _{N-1}	FP _{N-1}	PW _{N-1}	PA _{N-1}
	TtP _N	FR _N	SR _N	RT _N	RT80 _N	RT90 _N	PtP _N	FP _N	PW _N	PA _N

Obrázek 6.8 – Matice detekovaných parametrů pro vápníkový signál

Délka signálu (1...N cyklů) →	CP ₁	RP ₁	RP90 ₁	PW ₁	PA ₁
	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
	CP ₄	RP ₄	RP90 ₄	PW ₄	PA ₄
	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
	CP _{N-1}	RP _{N-1}	RP90 _{N-1}	PW _{N-1}	PA _{N-1}
	CP _N	RP _N	RP90 _N	PW _N	PA _N

Obrázek 6.9 - Matice detekovaných parametrů pro signál kontrakce

Hodnoty obsažené v maticích pro obě skupiny signálů jsou statisticky zpracovány. Zpracováním je získány parametry zobrazené v tabulce (Tabulka 6.1):

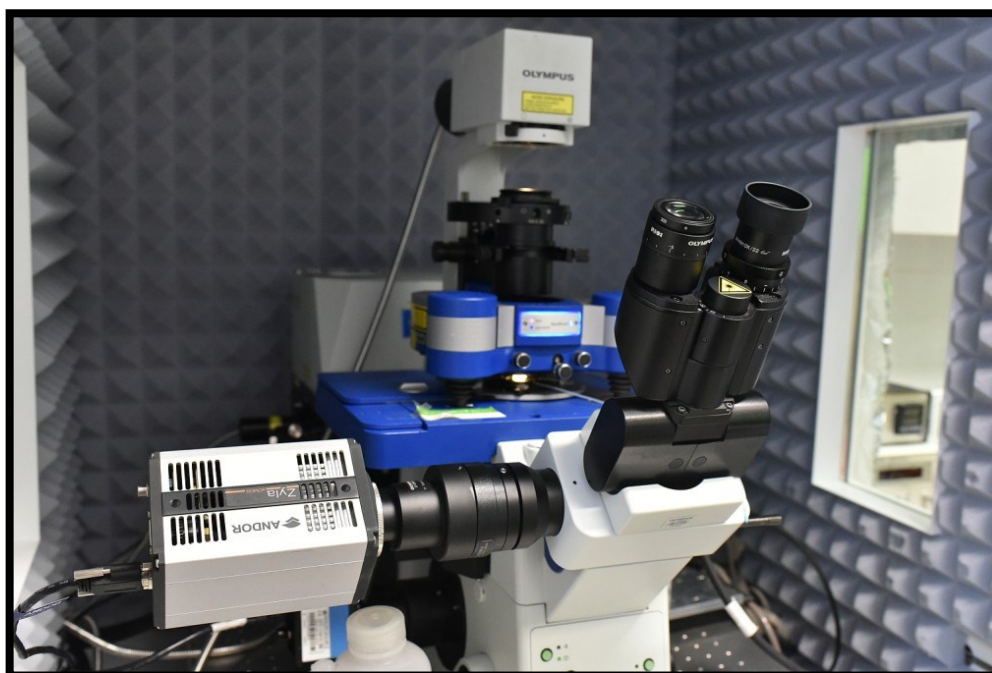
Tabulka 6.1 – Statistické hodnoty vypočtené pro rozměřené funkční parametry.

Název parametru	Pojmenování vektoru	Vztah	Číslo
Průměrná hodnota	FP_{avg}, PA_{avg}	$\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N A_i$	12
Standardní odchylka	FP_{std}, PA_{std}	$\sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N A_i - \mu ^2}$, kde μ je $\mu = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N A_i$	13
Rozptyl	FP_{var}, PA_{var}	$\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N A_i - \mu ^2$, kde μ je $\mu = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N A_i$	14
Minimální hodnota	FP_{min}, PA_{min}	Minimální hodnota z FP nebo PA	-
Maximální hodnota	FP_{max}, PA_{max}	Maximální hodnota z FP nebo PA	-
Nejčastěji se vyskytující se hodnota	FP_{mode}, PA_{mode}	Nejčastěji se vyskytující se hodnota u FP nebo PA	-

Vektor A obsažený ve vztazích uvedených v Tabulka 6.1 je nahrazen buď maximálními hodnotami detekovaných špiček signálu anebo jednotlivými časovými parametry matice na Obrázek 6.8 a Obrázek 6.9.

7 Praktická část A – Současné měření $[Ca^{2+}]_i$ a kontrakce iPSC-CM

Experimenty v této části byly realizovány na vybaveném vědeckém pracovišti Lékařské fakulty Masarykovy univerzity s využitím těla konfokálního mikroskopu Olympus FluoView 1200 s nainstalovaným AFM modulem JPK NanoWizard (JPK Instruments AG, SRN). Cílem bylo realizovat navrženou metodu měření kontrakce srdečních buněk a měření vápníkových transientů s využitím kombinace mikroskopie atomárních sil a fluorescenční mikroskopie. Dále bylo cílem metodu ověřit detailní analýzou získaných signálů jejich rozměření na důležité části a vyhodnocením změn při aplikaci kofeinu do média buněk. Důležitou součástí procesu zpracování dat byla filtrace získaných signálů, která zajišťovala eliminaci chyb a umožnila kvalitativně vyšší úroveň analýzy a hodnocení výstupů. Z tohoto důvodu byly použity celkem čtyři odlišné typy filtrace, u kterých bylo provedeno porovnání úspěšnosti.

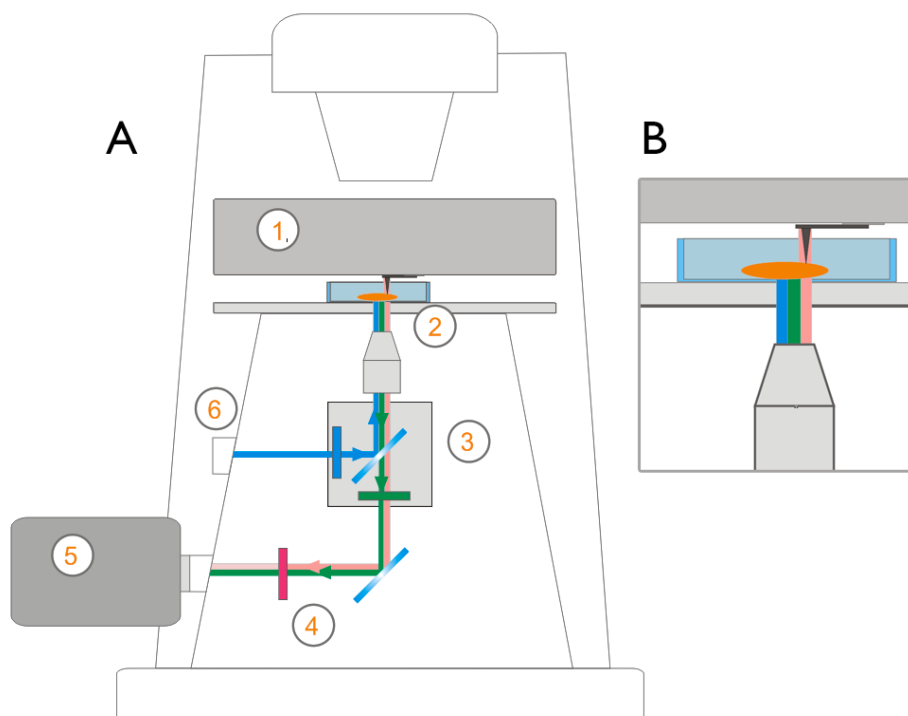


Obrázek 7.1 – Ukázka pracoviště s mikroskopem Olympus FluoView FV1200, zařízením JPK NanoWizard a připojenou kamerou Andor Zyla 5.5.

7.1 Akvizice dat

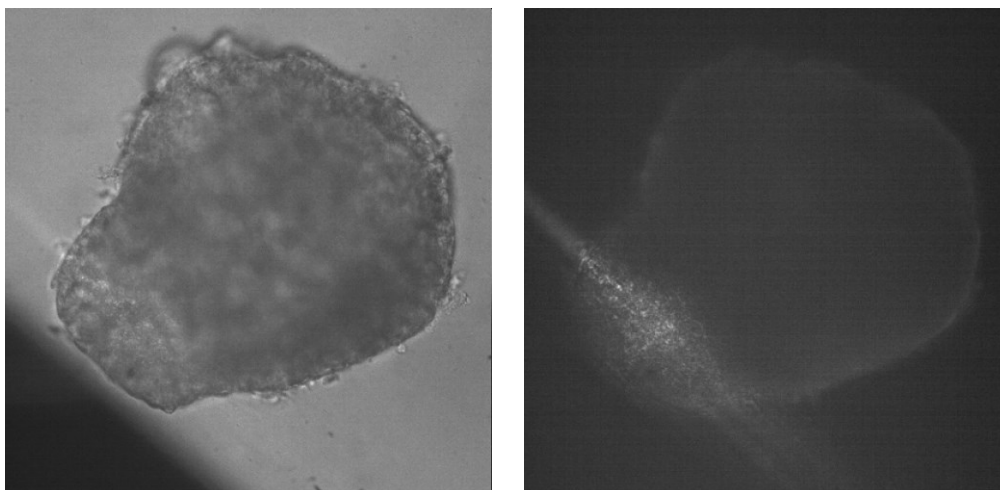
Při simultánním měření kontrakce iPSC shluků kardiomyocytů (EB) a koncentrace intracelulárního vápníku probíhala akvizice dat dvěma různými způsoby. Záznam dat mikroskopii atomárních sil byl pořízen s využitím k tomu určené sestavy JPK NanoWizard (JPK Instruments AG, SRN) s rozsáhlým akvizičním zařízením a pracovní stanicí. Data byla zaznamenána v obslužném software dodaném výrobcem sestavy. Data byla pořízena se vzorkovací frekvencí 1000 Hz a zahrnují záznam výškového signálu a naměřené síly. Optické záznamy dynamických změn koncentrace intracelulárního vápníku byly pořízeny na mikroskopu Olympus FluoView FV1200 (bez využití konfokálního režimu), základní optickou částí optického zařízení je Olympus IX-81. Data byla získána při optickém zvětšení 20 x. Pro záznam optických dat byla použita kamera Andor Zyla 5.5 a samostatná pracovní výpočetní stanice. Kamera byla připojena přes komunikační rozhraní USB 3.0 k integrovanému SSD disku Samsung EVO 850 s efektivní propustností zhruba mezi 400 a 550 MB/s. Pro záznam dat byla nastavena samostatná

složka, do které probíhal vysokorychlostní zápis dělených datových souborů. Záznam optických dat byl synchronizován se záznamem dat AFM. Ilustrace optického řešení je uvedena na Obrázek 7.2.



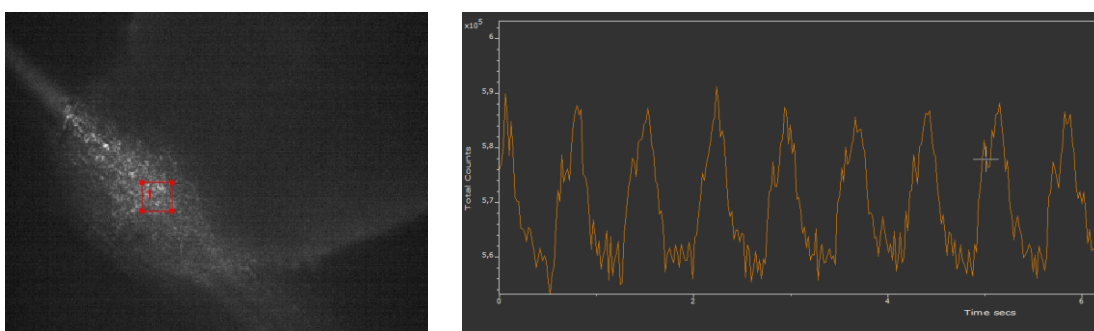
Obrázek 7.2 – A. Ilustrace vyjadřující realizaci technického řešení optické části zařízení a připojení modulu AFM. Hlavice modulu AFM JPK NanoWizard (1) je připojena nad stolek (2) mikroskopu, ve kterém je uchycen vzorek. Hrot je v kontaktu s měřeným objektem. Vzorek je nasvícen excitačním světlem přivedeným z externího zdroje (6) a fluorescenční emise použitého barviva Fluo-4 prostupuje zpět objektivem přes fluorescenční kostku (3) až ke kameře (5). Spolu s fluorescenčním světlem ke snímáči postupuje laserové rozptýlené záření, které je filtrováno filtrem typu dolní propust (Thorlabs FES 650). Ke snímáči však prochází ještě malá část záření. B. Detail oblasti misky se vzorkem.

V kroku nastavení snímání bylo nutné nastavit vhodné zorné pole (resp. rozlišení kamery, které zabírá výsledné zorné pole) v kombinaci s odpovídající požadovanou snímkovací frekvencí a přitom zajistit vhodnou pozici držáku s hrotem AFM. Kamera Andor Zyla 5.5 byla proto nejdříve nastavena do náhledového režimu v plném prostorovém rozlišení (2560 x 2160 px), ve kterém probíhalo nastavení vhodného zvětšení dostupnými objektivy (4X, 10X, 20X, 40X) a centrování objektu. Současně byla kontrolou obrazu na kameře nastavena pozice hrotu AFM na vhodnou pozici tak, aby držák hrotu a samotný hrot v co nejmenším měřítku zakrýval obraz měřeného objektu. Následně bylo rozlišení sníženo na 1700 x 1700 px pro dosažení vhodné snímkovací frekvence (konkrétně 49,67 Hz). Ukázka získaného snímku obsahující objekt EB s pozicí držáku hrotu a hrotu do levé dolní části je na Obrázek 7.3.



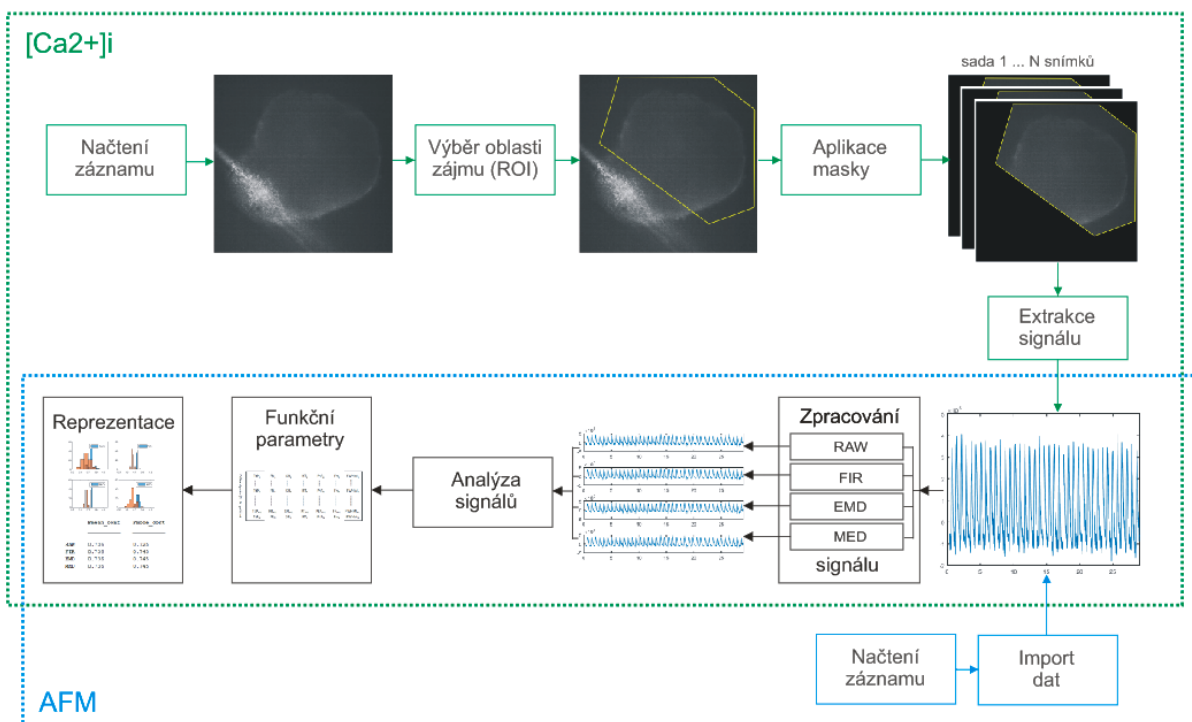
Obrázek 7.3 – Snímek s měřeným objektem (EB) vlevo, vpravo fluorescenční snímek obsahující fluorescenci Fluo-4 u zbytkového vápníku v klidovém stavu a artefakt vzniklý rozptýleným laserovým světlem.

Držák zakrývá část snímku mimo EB. Jeho hrot je umístěn na levé spodní části EB, a jelikož se jeho hlavní část nachází mimo rovinu ostroiti a v obraze se jeví jako rozmazaný (rozostřený), téměř zanedbatelně překrývá část EB. Ve fluorescenčním snímku (Obrázek 7.3 napravo) je patrný výrazný artefakt vzniklý rozptylem laserového záření použitého v zařízení JPK AFM pro odraz na držáku s hrotem. Laserový paprsek byl filtrován optickým filtrem typu dolní propust Thorlabs FES650 s mezní vlnovou délkou 650 nm. Část laserového světla však pronikala uvedeným způsobem směrem ke snímáči kamery. Zbylou část obrazu, mimo tento artefakt, je možné použít pro analýzu. Pokud by artefakt, resp. intenzita pixelů v oblasti artefaktu, byly v čase neměnné, artefakt by způsoboval pouze offset signálu. Výběrem oblasti 1 na snímku Obrázek 7.4 a časovou analýzou sumy pixelů v této oblasti lze rozpoznat, že dochází k cyklickým změnám v hodnotách. Tento signál se odlišuje od signálu vápníkových transientů, které vykazují vyšší strmou částí impulsů. Přesněji, odpovídá signálu kontrakce, neboť rozptýlené laserové světlo prostorově rozlišuje jednotlivé kardiomyocyty či jejich skupiny a signál je výsledkem jejich vzájemného pohybu (smršťování anebo rozpínání) při kontrakci a nástupné relaxaci. V signálu je superponován také mnohem slabší signál vápníkových transientů z této malé oblasti.



Obrázek 7.4 – Signál získaný z vyznačené oblasti v softwaru Andor SOLIS. Signál je dán sumou pixelů oblasti v čase.

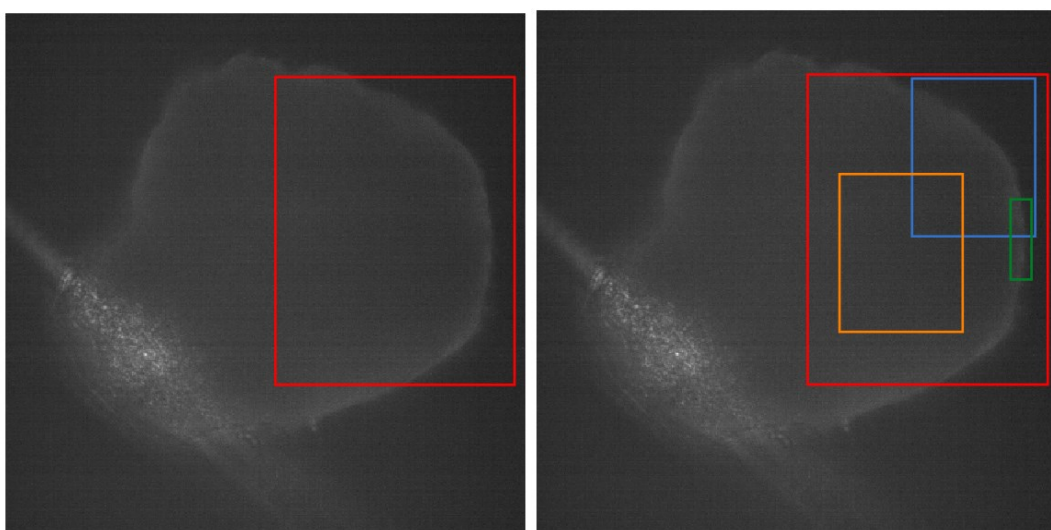
Rozčleněná nasnímaná optická data byla v programovém vybavení *Andor SOLIS for Imaging* zpracována do jednotného souboru a exportována ve formě videosekvence v bezztrátovém formátu AVI (soubory s příponou .avi). Následně byla získaná data spolu s exportovanými daty pořízenými AFM načtena do prostředí Matlab pro další zpracování.



Obrázek 7.5 – Schéma potupu pro získání signálů optickou metodou a pomocí zařízení AFM, filtrace čtyřmi různými postupy a další hodnocení analyzovaných signálů. Úseky odlišené přerušovanou čarou, barevně odlišené, znázorňují odlišné procesy pro data AFM a data získaná opticky.

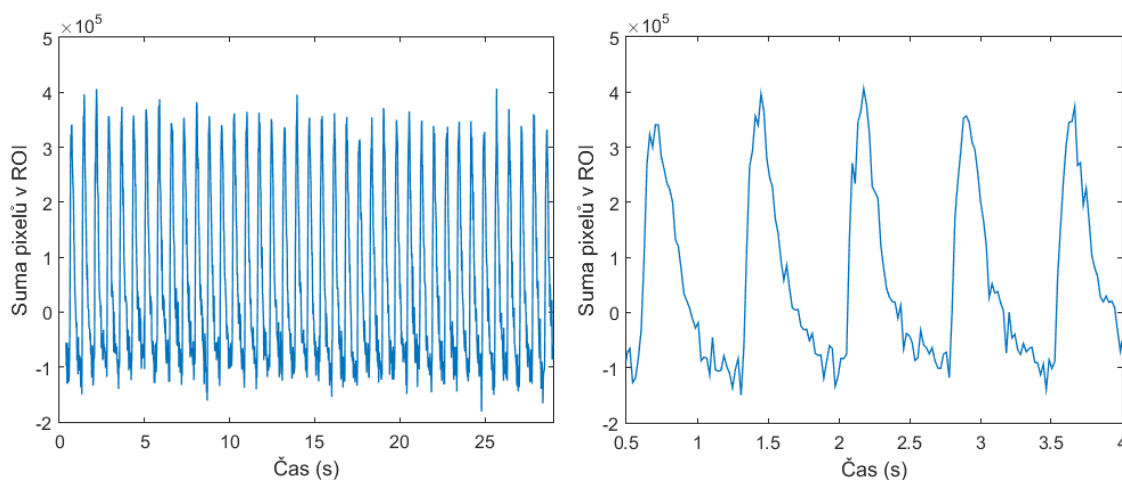
7.2 Měření vápníkových transientů

V prvním kroku byla postupným manuálním umístěním skupiny (volného počtu) bodů v prvním snímku záznamu vymezena oblast zájmu (ROI). V běžném případě, pokud by záznam obsahoval pouze fluorescenční snímek buňky bez přítomnosti optického artefaktu, by tento krok nebyl nutný a oblast zájmu by mohla prakticky tvořit vhodně nastavená celá oblast zorného pole. Z vybrané oblasti byla vytvořena maska, která byla aplikována na celou sadu snímků v záznamu. Extrahovaný signál pak byl získán postupným výpočtem sumy pixelů v ROI jednotlivých snímků v časové souslednosti. Nezpracovaný signál byl podroben filtraci. Při filtraci byly na stejný signál aplikovány tři různé typy filtrů – lineární filtrace (typu FIR), EEMD a mediánová filtrace. Pro tyto tři typy filtrací jsou v grafech a tabulkách dále použity třípísmenné zkratky FIR, EMD a MED. Výsledkem jsou celkem čtyři signály (včetně originálního nezpracovaného signálu), které byly zpracovány algoritmy rozměření signálů. Získané funkční parametry byly statisticky zpracovány a reprezentovány graficky a tabulkově. Proces, potřebný pro získání a hodnocení dat s vápníkovými transienty je vymezen zelenou přerušovanou čarou na Obrázek 7.5. Při zpracování dat získaných měřeními na zařízení JPK AFM se obdobně jako u předešlého případu využívá obdobných kroků práce se signály a hodnocením získaných dat. Liší se však způsob získání nezpracovaných signálů - data jsou po načtení souborů do prostředí Matlab importována, přesněji jsou ze vstupních souborů extrahována a transformována do vhodného formátu. Celý proces je na obrázku Obrázek 7.5 vymezen modrou přerušovanou čarou. Jednotlivé signály v obou skupinách se od sebe liší, mírně se liší i způsob zpracování signálů. Tato specifika jsou dále popsána. Předpokladem je, že charakter vápníkových signálů – amplituda, SNR a také tvar mohou být závislé na vybrané oblasti zájmu. Tento předpoklad je testován později. V tomto případě byla vybrána rozsáhlá oblast bez přítomnosti artefaktu:



Obrázek 7.6 – Oblast zájmu, ze které byly získány vápníkové transienty (vlevo). Alternativní oblasti použité pro porovnání signálů z různých ROI (vpravo).

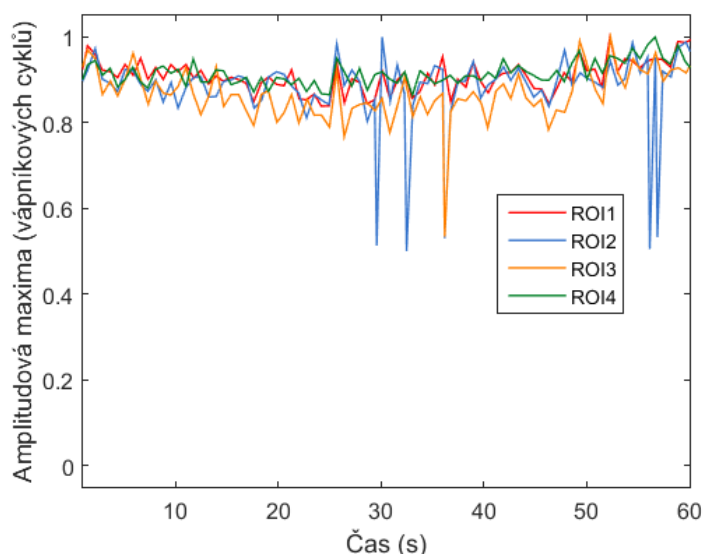
Ukázka získaných signálů vápníkových transientů je uvedena na Obrázek 7.7. Vlevo na obrázku je 29 sekundový úsek signálu s celkem 39 cykly, vpravo detail pěti vybraných cyklů. Před zpracováním (normalizací) je jejich amplituda získána v počtech (sumě) hodnot pixelů v ROI.



Obrázek 7.7 – 29s úsek získaných vápníkových transientů před filtrací (vlevo), detail signálu (vpravo).

Kvalita signálů vápníkových transientů (např. SNR) a amplituda signálu logicky závisí na volbě – pozici a zejména velikosti – ROI. Následující analýza ukazuje vliv volby velikosti a pozice odlišných ROI. Oblasti zájmu jsou zobrazeny na Obrázek 7.6 vpravo a barevně odpovídají značením oblastí zájmu u extrahovaných signálů. Kompletní 60s signály jsou uvedeny v Příloze 1, Obrázek 11.1 obsahuje signály bez provedené úpravy získané z jednotlivých ROI jako sumy pixelů v jednotlivých oblastech ze sady snímků sekvence. Z výsledků je patrné, že se liší poměrem SNR a hodnotou amplitudy, jak bylo předpokládáno. Navíc byly u jednotlivých signálů detekovány špičky a vyneseny formou spojnicového grafu, jehož úkolem je zobrazení rozdílů hodnot špiček různých ROI. Kompletní 60s úsek je zobrazen také v Příloze 1 (Obrázek 11.2). Zjednodušená verze se zobrazením spojnic bodů je zobrazena na Obrázek 7.8. Z výsledků je patrné značné lokální odchýlení některých hodnot špiček v některých z

hodnocených oblastí. Z obrázku jsou tyto nežádoucí negativní výchylky vidět u ROI2 (celkem 4) a ROI3 (celkem 1). Z toho je patrné, že některé oblasti zájmu nejsou vhodné pro analýzu vápníkových transientů. Příkladem mohou být úzké okrajové oblasti měřeného objektu, kde má na signál vápníkových transientů vliv kontrakce EB a pohyb hranice EB.

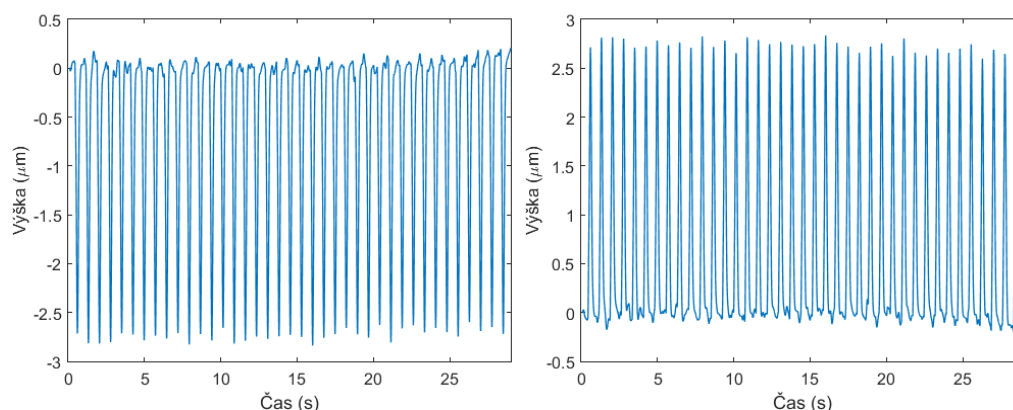


Obrázek 7.8 – Signály získané pro jednotlivé ROI z Obrázek 7.6 (vpravo) detekcí špiček signálu a jejich vynesení do grafu a následným zobrazením formou spojnicového grafu. U signálů špiček některých ROI jsou patrné lokální odchylky.

Při opakované akvizici - v prvním případě při pořízení kontrolního signálu, - ve druhém případě při pořízení signálu po aplikaci testované látky, proto musí měřené oblasti pro získání signálu vápníkových transientů zůstat shodné – velikostí i pozicí.

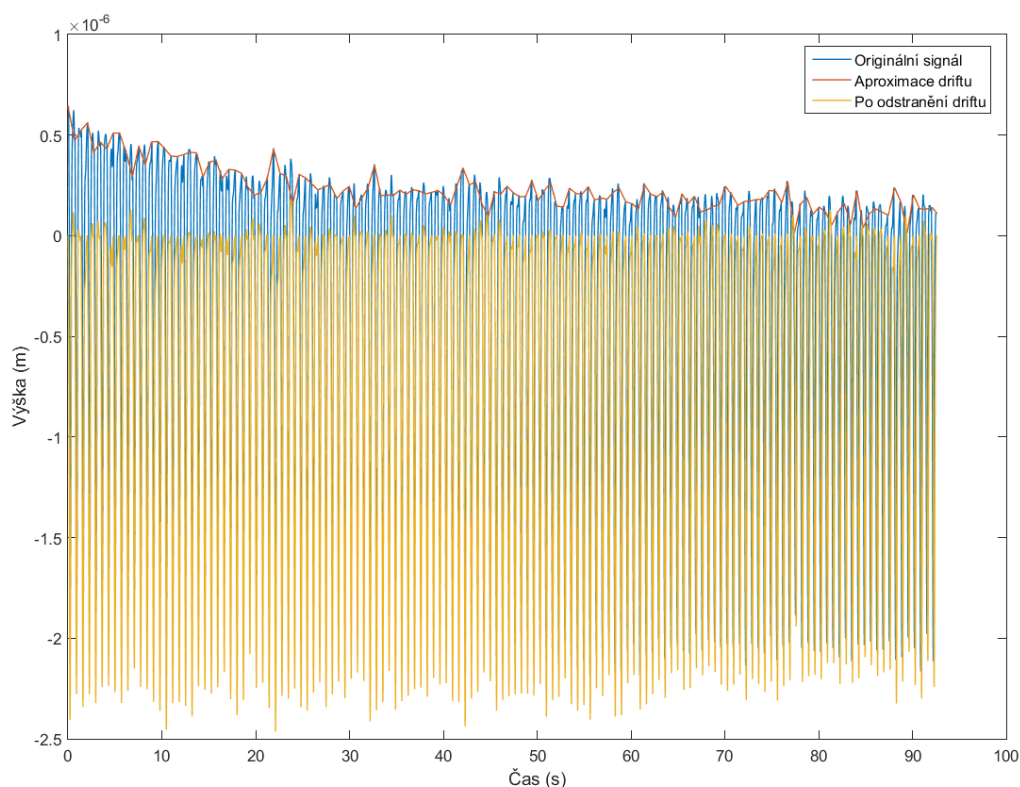
7.3 Měření kontrakce s využitím AFM

Signály pořízené zařízením AFM obsahují dva paralelně získané signály – výšku měřenou řádově v μm a sílu měřenou řádově v nN. Pro ukázkou jsou tyto dva typy signálů zobrazeny ve 29 sekundovém úseku na Obrázek 7.9 a Obrázek 7.11. Signály jsou dále v textu nazývány jako výškový signál a silový signál AFM. Další průběhy signálů zahrnující 39 cyklů kontrakce v rámci 29 sekund jsou zobrazeny na Obrázek 7.9 a Obrázek 7.11 spolu s průběhy demonstrující první kroky zpracování signálu. Signál měřené výšky začíná zhruba v nule a spadá do záporných hodnot, neboť je hrot položen na měřeném objektu shora a směr měřené kontrakce je tak ve vertikální směrem dolů. Vhodným posunem vzniká signál, který odpovídá reálnému poklesu výšky objektu z jeho maximální hodnoty v klidovém stavu do nižších hodnot při kontrakci. Jeho převrácením pak vzniká signál odpovídající kontrakci buňky, jehož amplituda při kontrakci roste.



Obrázek 7.9 – 29s úsek výškového AFM signálu. Vlevo po nasnímání a načtení, vpravo invertovaný.

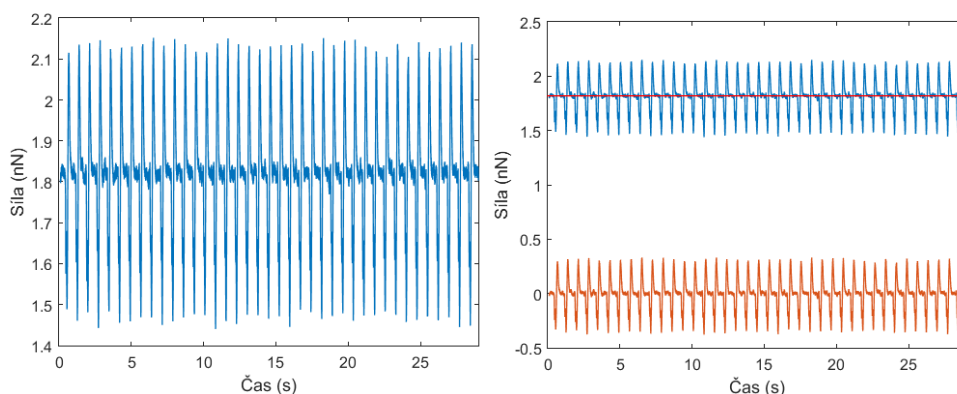
Pokud u výškového signálu v čase výrazně roste nebo klesá drift nulové izoliny, je proto provedeno její vyrovnaní. Vliv driftu byl zjištěn při rozměření signálu. Nejdříve byly nalezeny hodnoty špiček a poté počáteční body t_0 jednotlivých cyklů. Poté byly pro každou dvojici t_{0n} aktuálního a t_{0n+1} následujícího cyklu zvoleno okno, kde t_{0n} a t_{0n+1} jsou počáteční a koncový bod okna. Tyto dvojice hodnot byly interpolovány lineární interpolací na délku okna, lineární interpolace tak představuje odhad poklesu, resp. nárůstu izoliny signálu. Ve výsledném kroku byla od vybraných úseků signálu odečtená uvedená interpolace. Tento způsob se ukázal jako vhodný pro účely následné analýzy. Příklad aplikace uvedeného postupu včetně vyznačeného driftu či je uveden na Obrázek 7.10.



Obrázek 7.10 – Původní signál s vyznačením driftu a signál po odstranění driftu.

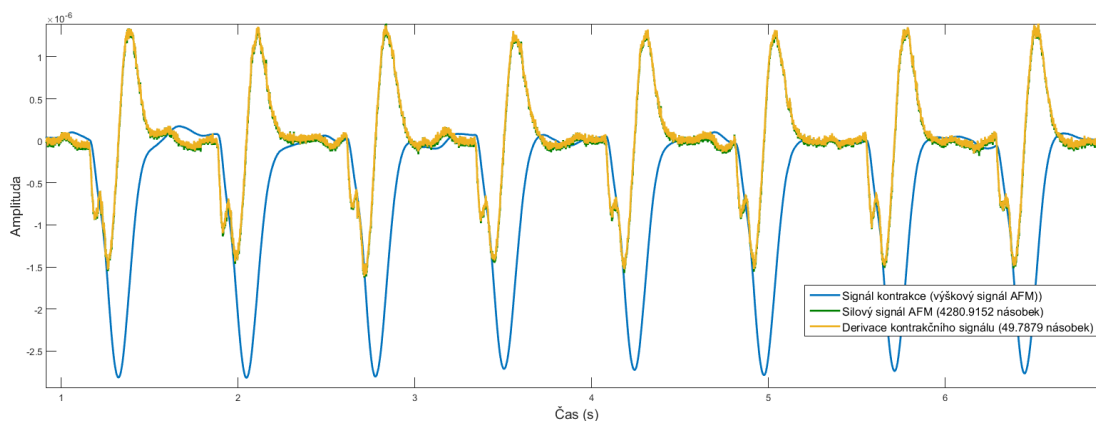
Signál měřené síly vykazuje odlišný charakter. Signál lze rozdělit na dvě části. První část narůstá směrem k maximu od mezní středové horizontální linie (Obrázek 7.11) ve fázi kontrakce EB a druhá

část, která klesá od mezní středové horizontální linie k minimu, odpovídá relaxaci EB, která nastává po jeho stažení, dokud se nevrátí do původní velikosti. V signálu je tedy nalezena středová linie a je zajištěn posun o tuto hodnotu na nulu (Obrázek 7.11, napravo).



Obrázek 7.11 - Výsledek po nalezení středové linie signálu a posun této linie na úroveň nuly.

Výškový i silový signál vykazují vzájemnou souvislost. Tuto souvislost prezentuje Obrázek 7.12 se dvěma cykly signálů. Na první pohled je znatelná souvislost překmitu silového signálu ze záporných hodnot do kladných hodnot s pozicí maximální hodnoty výškového signálu. Derivací výškového signálu byl získán signál, který je v obrázku taktéž obsažen a se silovým signálem se s vysokou přesností překrývá. Tímto bylo ověřeno, že derivací výškového signálu je získán signál téměř identický silovému signálu. Signály se však liší řádem v amplitudě (a ve fyzikální jednotce), a proto bylo nutné jejich amplitudy potřeba nejdříve přepočíst. Hodnoty přepočtu jsou uvedeny v legendě u grafu.



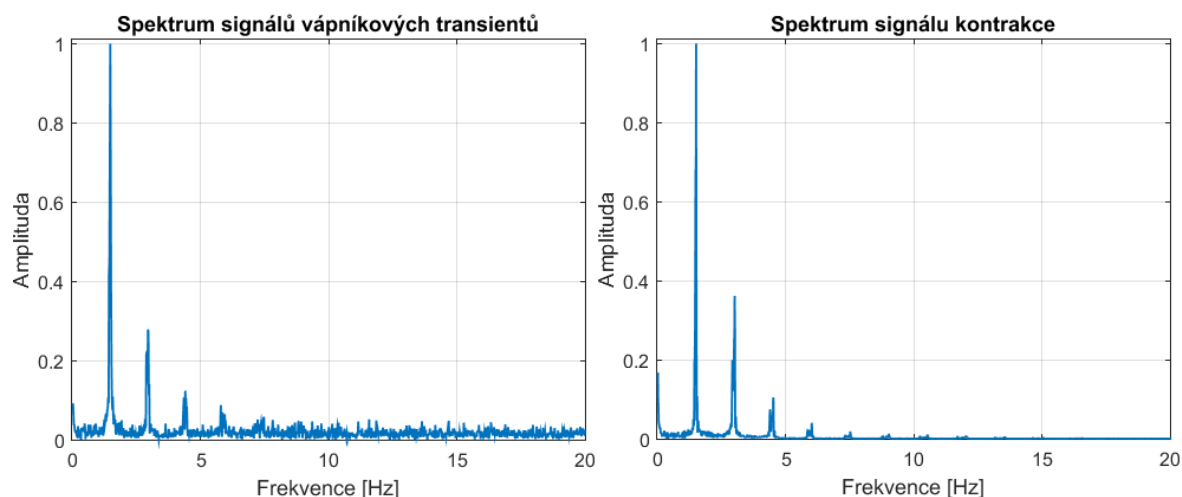
Obrázek 7.12 – Souvislost mezi výškovým a silovým signálem AFM.

U vápníkových i kontrakčních signálů je provedena normalizace, aby bylo možné provést jejich další porovnání a využití v celkovém srovnání v experimentu. Aby však bylo možné odlišit změnu amplitudy signálu kontrolního a testovaného, byl zaznamenán před normalizací obou těchto signálů vzájemný poměr.

Vápníkový signál vyžaduje výpočet vedoucí k odstranění fluorescence přítomné v klidové fázi (F_0). Hodnoty měřeného vápníku jsou pak vyjádřeny jako $\Delta F/F_0$. Se znalostí disociační konstanty Ca^{2+} indikátoru je pak možné kvantitativně vyjádřit koncentraci cytosolového vápníku dle rovnice (1). Pro porovnání vápníkových signálů v dalším textu je zvolena relativní hodnota signálu ($\Delta F/F_0$).

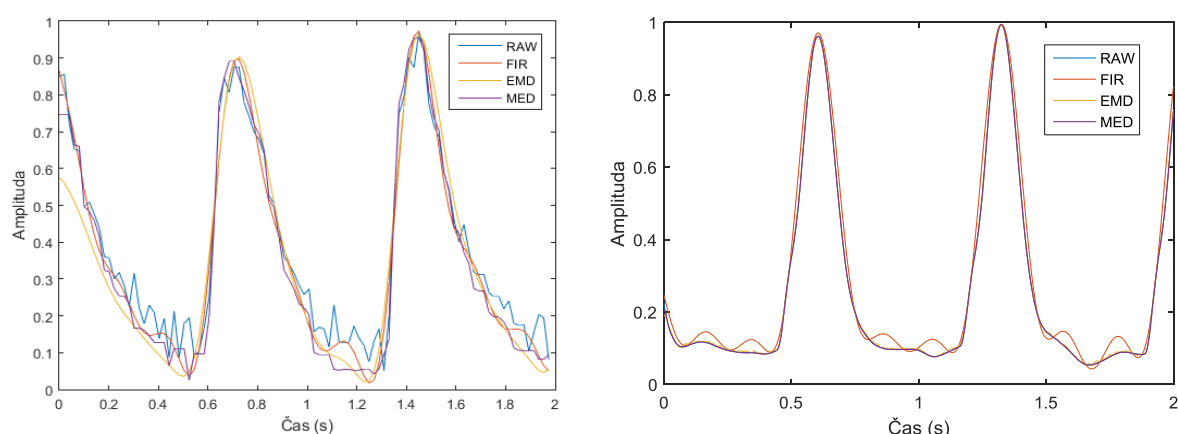
7.4 Hodnocení vlastností filtrace

Filtrace má u signálů zajistit kvalitní odstranění aditivního šumu. To má za následek snadnější a přesnější lokalizaci stěžejních bodů, které následně slouží k rozměření a získání funkčních parametrů ze signálů. Šum, který je v signálu vápníkových transientů přítomen, pochází z procesů spojených se získáváním obrazů obrazovým snímačem a elektronikou kamery. Zejména se jedná o čtecí a termální šum detektoru. Šum přítomný v signálu je vysokofrekvenčního charakteru. U signálů kontrakce získaného mikroskopií atomárních sil je zdrojem signálu měřicí elektronika (také elektro-optika systému) a výrazný vliv na vznik šumu mají vibrace pocházející z okolního prostředí měřicího zařízení.



Obrázek 7.13 – Spektra signálů získaných po aplikaci kofeinu. Nalevo spektrum signálu vápníkových transientů (získaných opticky) a napravo spektrum signálu kontrakce pořízeného s využitím mikroskopie atomárních sil.

Pro filtraci byly použity následující filtrační metody: lineární filtrace, EEMD filtrace a mediánová filtrace, které nachází v dnešní době využití v různých oblastech a liší se svými vlastnostmi a účinností pro různé typy signálů. Signály kontrakce (AFM) a vápníkové signály po provedené filtraci jsou zobrazeny společně v detailu na Obrázek 7.14 a Obrázek 7.15. V další části je pak zmíněno nastavení filtrací a zobrazení výsledků filtrace u jednotlivých typů filtračních metod.



Obrázek 7.14 – Detail vápníkového signálu (vlevo) a signálu AFM (vpravo) po provedené filtraci.

V první řadě byla úspěšnost hodnocena z hlediska úrovně potlačení přítomného šumu. Proto byl s využitím funkce $snr()$ v programovém prostředí Matlab 2015b vypočten SNR pro originální a

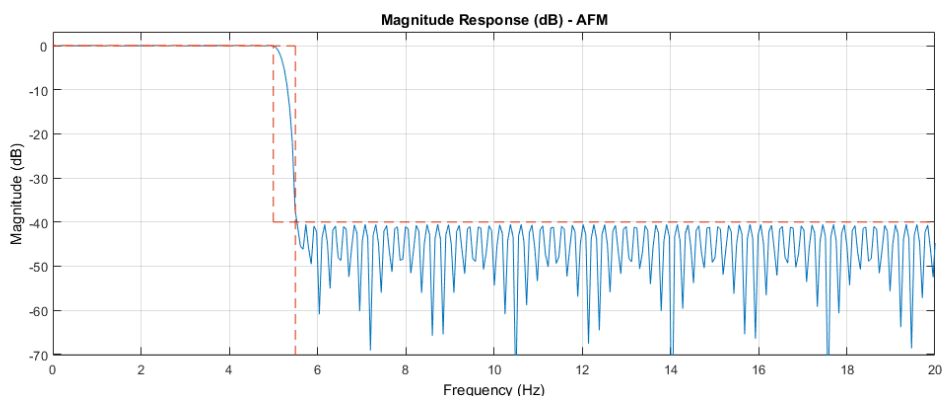
filtrované signály, a to pro kontrolní signál a signál získaný po aplikaci kofeinu, výsledky jsou zobrazeny v Tabulka 7.1 v decibelech.

Tabulka 7.1 – Tabulka vyjadřující úspěšnost filtrace. Hodnoty vyjadřují vypočtený poměr signál-šum v dB. Pozitivní výsledky jsou patrné zejména u signálů vápníkových transientů.

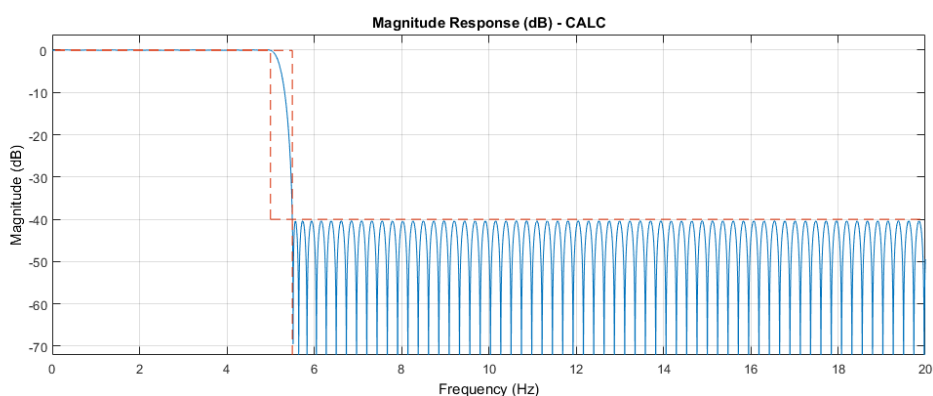
SNR [dB]	Signál kontrakce (AFM)				Vápníkové transienty (optické měření)			
	Originální	FIR	EEMD	Medián.	Originální	FIR	EEMD	Medián.
Kontrolní	19,73	20,49	19,71	19,73	14,10	20,97	21,80	16,81
S kofeinem	20,73	21,82	20,70	20,73	7,35	14,22	14,61	11,62

Lineární filtrace

Pro filtraci signálu AFM je u lineárního filtru zvolena dolní propust typu FIR s mezní frekvencí 5 Hz a s poklesem 40 dB na 0,5 Hz. Povolené zvlnění v propustné oblasti je 0,1 dB. Na základě zobrazeného spektra byl filtr nastaven manuálně. Ze spektra signálu byla odvozena mezní frekvence, která filtruje šum, ale nenarušuje signál. V tomto případě byl požadován ostrý filtr, takže byl zvolen ostrý výrazný pokles 40 dB na 0,5 Hz, s co nejmenším zvlněním v propustné oblasti a zároveň o takové délce impulzní charakteristiky, která je ještě aplikovatelná. Frekvenční charakteristika filtru je uvedena na Obrázek 7.15.



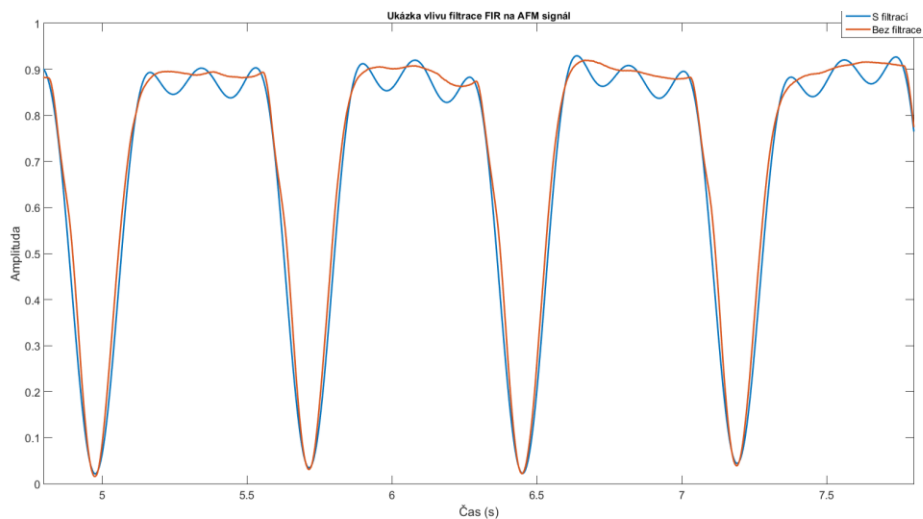
Obrázek 7.15 – Frekvenční charakteristika FIR filtru použitého pro filtraci AFM signálu.



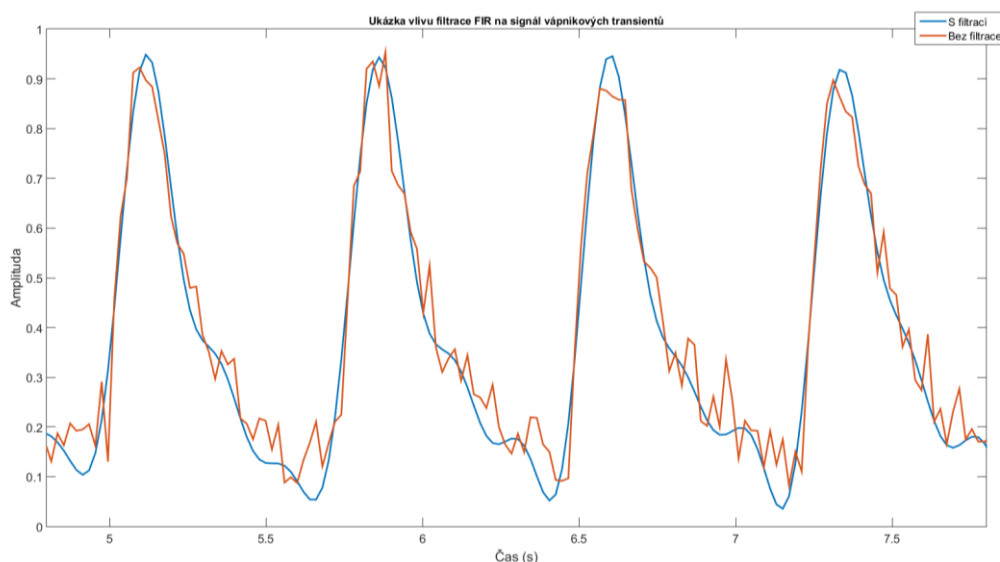
Obrázek 7.16 – Frekvenční charakteristika FIR filtru použitého pro filtraci AFM signálu.

Lineární filtrace dolní propustí má pro AFM signál pozitivní i negativní dopad. Filtr jednak do signálu zanáší nežádoucí zvlnění zkreslující špičky, jak je patrné z Obrázek 7.17. Na druhou stranu však dochází ke konstantnímu poklesu hodnot u každé špičky, takže při relativním hodnocení signálů v kontrolním a

testovacím experimentu tato vlastnost nepůsobí na výsledky negativně. Při filtraci vápníkového signálu (Obrázek 7.18) jsou výsledky velmi pozitivní – filtrace způsobuje účelné vyhlazení signálu, viz výrazné zvýšení SNR (Tabulka 7.1).



Obrázek 7.17 – Ukázka vlivu filtrace FIR na výškový AFM signál. 3s úsek normalizovaného signálu.

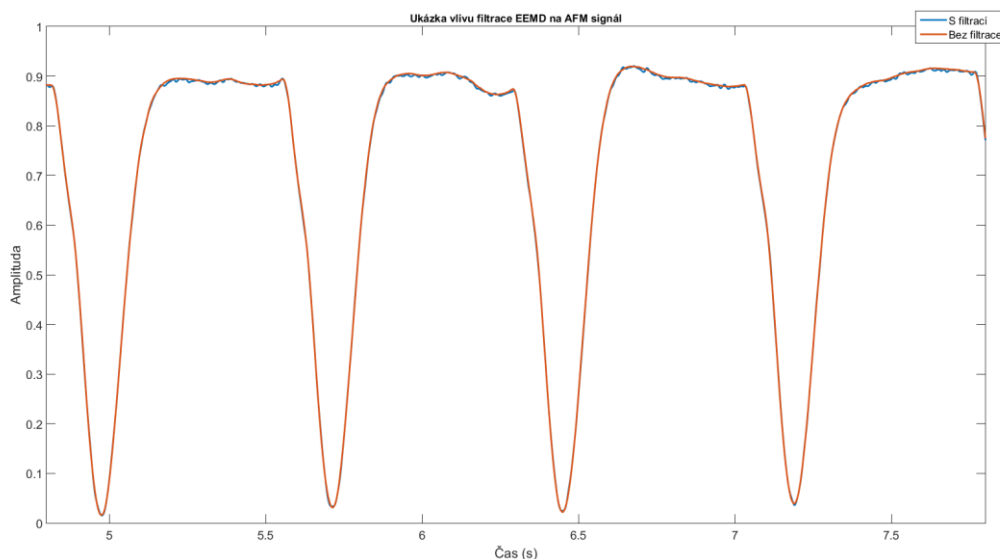


Obrázek 7.18 – Ukázka vlivu filtrace FIR na signál vápníkových transientů. 3s úsek normalizovaného signálu.

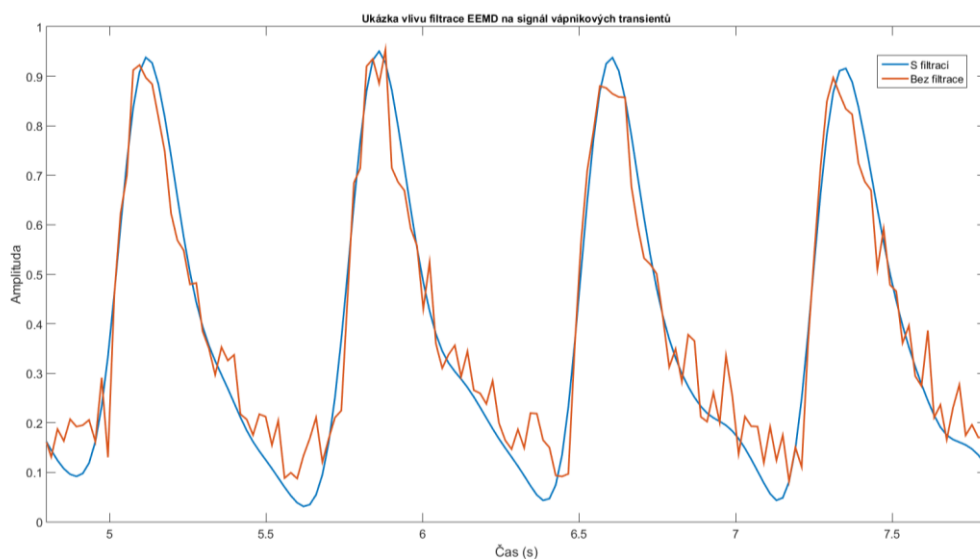
EEMD filtrace

EEMD ([138]) je poměrně nová metoda používaná v obecných případech i ve speciálních aplikacích. Příkladem může být využití EEMD pro náročnou dekompozici EKG těhotných žen k oddělení mateřského a fetálního EKG. Také je základem tzv. Hilbertovy-Huangovy transformace (HHT [139]), za účelem zkoumání časově-frekvenčních změn v nestacionárních signálech. Mezi výhody EEMD patří zejména možnost filtrace rušení, které se ve spektrální oblasti i extrémně překrývá se spektrem užitečného signálu, a to bez předpokladu stacionarity signálu. Nevýhodou metody je značná výpočetní náročnost. Pro nastavení filtrace je využit přímo postup autorů metody publikovaný v [140]. Při filtraci vápníkového signálu jsou vynechány dvě nejvyšší komponenty, u AFM výškového signálu 3 nejvyšší komponenty rozloženého signálu. Metoda při filtraci vápníkového i AFM signálu vykazuje výborné

výsledky, jediným záporným vlivem je posun amplitudy špiček ve filtrovaném signálu. Změny způsobené filtrací jsou patrné z obrázků Obrázek 7.19 a Obrázek 7.20.



Obrázek 7.19 – Ukázka vlivu filtrace EEMD na výškový AFM signál. 3s úsek normalizovaného signálu.

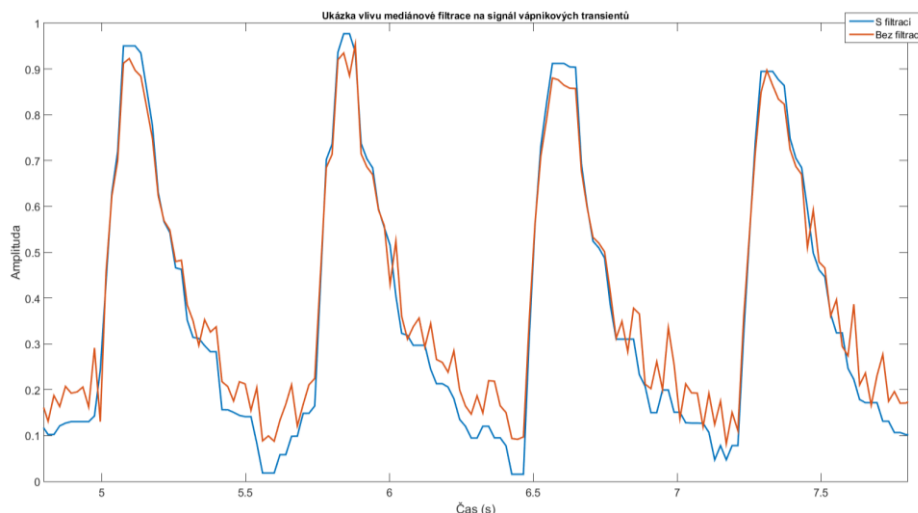


Obrázek 7.20 – Ukázka vlivu filtrace EEMD na signál vápníkových transientů. 3s úsek normalizovaného signálu.

Mediánová filtrace

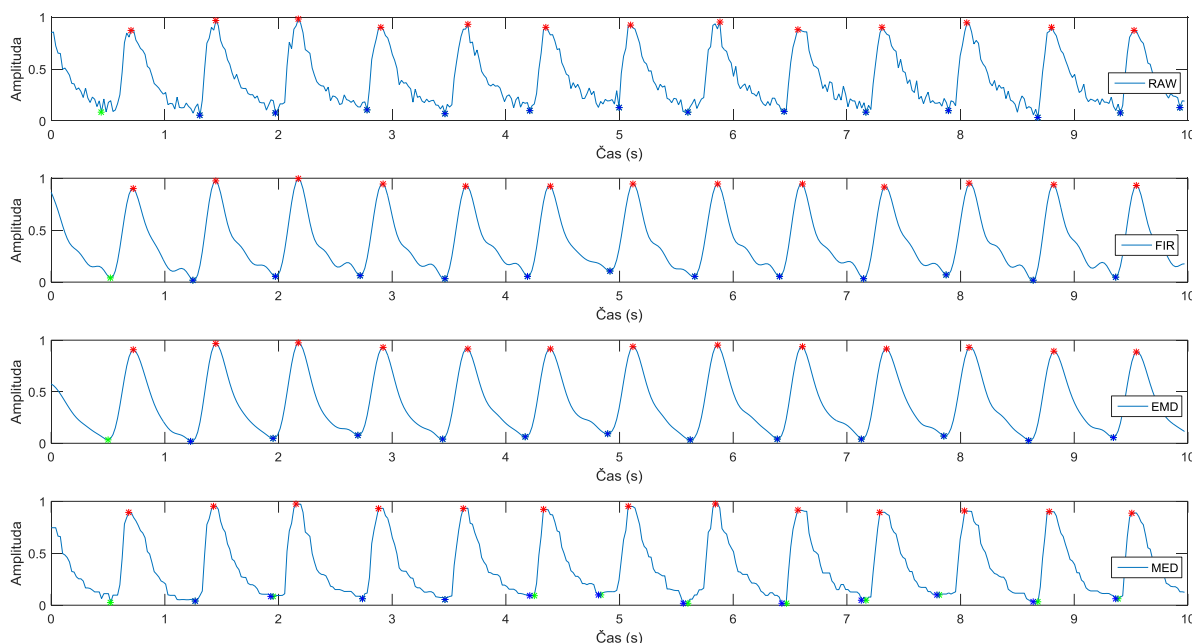
Mediánová filtrace je nelineární filtrace sloužící k potlačení krátkodobého rušení. Signál je v rámci okna o zvolené délce zpracován tak, že jednotlivé hodnoty signálu jsou seřazeny podle velikosti a výstupní vzorek filtru je roven velikosti vzorku uprostřed okna. Efekt filtrace samozřejmě závisí na zvolené délce okna filtru. Podle šířky okna dochází k potlačení jednorázových záskmitů v signálu a částečně i k porušení užitečné složky signálu, zejména v jeho rychlých změnách. Může tak dojít ke snížení časová rozlišovací schopnosti celého systému zpracování signálu. Mezi nevýhody tohoto typu filtrace patří také vznik nefiltrovaného prostoru na začátku a konci signálu, a to o délce $(k-1)/2$, kde k je délka použitého okna.

Pro vápníkový signál bylo okno experimentálně nastaveno na pět vzorků a pro AFM na délku 11 vzorků. Oproti lineární filtraci je výhodou, že mediánový filtr do signálu nevnáší umělé nízkofrekvenční složky. Mediánová filtrace však celkově zhoršuje schopnost detekce pozic špiček anebo dalších bodů v signálu.

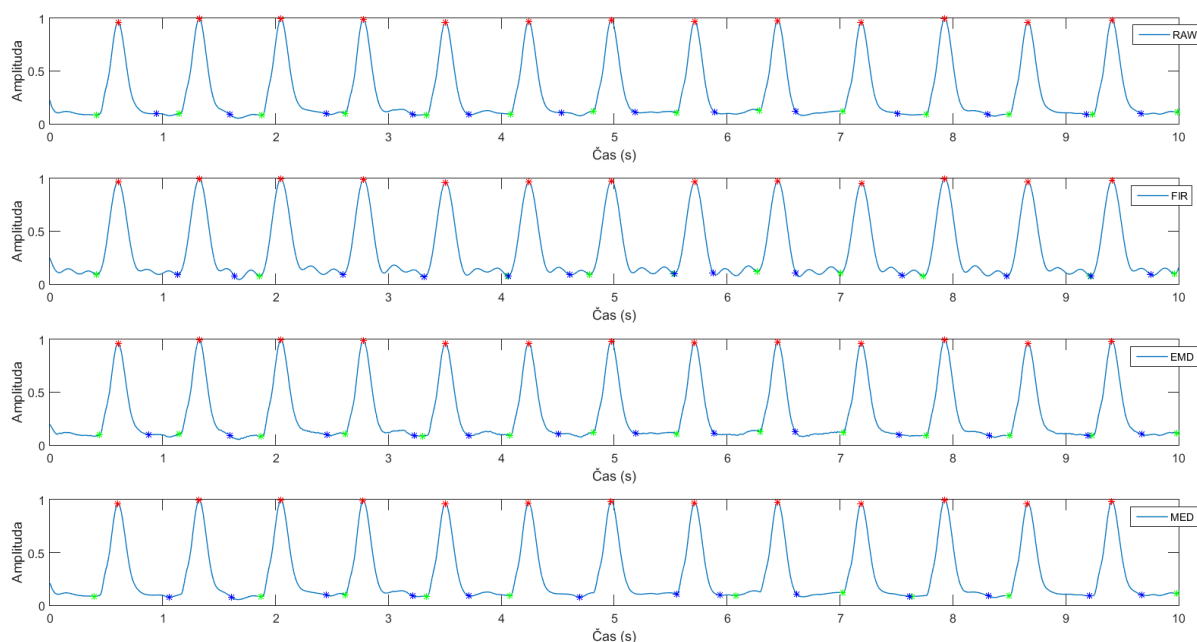


Obrázek 7.21 – Ukázka vlivu mediánové filtrace na signál vápníkových transientů. 3s úsek normalizovaného signálu.

V následujícím kroku bylo provedeno rozměření signálů, a to originálního signálu a signálů dané výstupem po filtracích lineární filtrací, EEMD filtrací a mediánové filtrací. Výsledkem byla sada parametrů dle výčtu a popisu parametrů z kap. 0, které byly dále hodnoceny. Na následujícím obrázku (Obrázek 7.22) je ukázka 10s úseků jednotlivých signálů, u kterých jsou vyznačeny nalezené body t_0 , t_{max} , t_{100} , které jsou stěžejními body pro výpočet zmíněných parametrů signálu. Z ukázky je patrné, že pozice těchto bodů je u jednotlivých signálů odlišná.



Obrázek 7.22 – Získaný signál vápníkových transientů s vyznačenými body t_0 , t_{max} a t_{100} . Z ukázek je patrné, že se body t_{max} a t_{100} v některých případech překrývají. Shodné pozice t_0 a t_{100} jsou patrné zejména u signálu vápníkových transientů, kde koncentrace vápníkových iontů po poklesu na konci cyklu bezprostředně začíná narůstat v dalším cyklu. Zatímco u signálů AFM je patrná prodleva mezi jednotlivými cykly.



Obrázek 7.23 - Výškový signál pořízený AFM. Všechny zobrazené signály obsahují detekované body t_0 , t_{max} a t_{100} . Některé pozice t_0 a t_{max} se překrývají, ale děje se tak spíše zřídka.

Obdobně je tomu u signálu AFM, viz Obrázek 7.23, kde jsou vlivem velkého poměru SNR špičky signálu detekovány velice přesně a jednotlivé filtrace nemají na pozici vzhledem k originálnímu signálu vliv. Jinak je tomu v detekovaných počátečních a koncových bodů u jednotlivých cyklů. Zde je pozice nalezených bodů u jednotlivých signálů někdy až výrazně odlišná. Tyto odchylky detekovaných bodů t_0 a t_{100} v signálu jsou zobrazeny Tabulka 7.2. Výrazné změny jsou vyznačeny tučně, názorný je parametr T_{dif} , který vyjadřuje procentuální odchylku od průměrné délky vápníkového cyklu anebo cyklu kontrakce.

Tabulka 7.2 - Minimální, maximální a průměrné hodnoty vzdálenosti bodů t_0 a t_{100} jako T vypočtené u originálního signálu a signálů, které prošly filtrací, pro vápníkový signál a signál kontrakce. T_{dif} značí procentuální rozdíl od průměrné délky vápníkového cyklu anebo cyklu kontrakce. Kladná změna znamená zvýšení vzdálenosti a záporná změna sblížení těchto bodů.

Rozsah t_0 a t_{100}			T_{\min} [s]	T_{\max} [s]	T_{avg} [s]	T_{dif} [%]
Vápníkový signál	Kontrolní	RAW	0,000	0,000	0,000	0,00
		FIR	0,000	0,000	0,000	0,00
		EEMD	0,000	0,000	0,000	0,00
		MED	0,000	0,081	0,027	2,02
	S kofeinem	RAW	0,000	0,705	0,058	3,92
		FIR	0,000	0,000	0,000	0,00
		EEMD	0,000	0,000	0,000	0,00
		MED	0,000	0,081	0,025	1,67

Rozsah t_0 a t_{100}			T_{\min} [s]	T_{\max} [s]	T_{avg} [s]	T_{dif} [%]
AFM signál	Kontrolní	RAW	0,000	0,424	0,226	16,60
		FIR	0,000	0,400	0,108	7,96
		EEMD	0,000	0,428	0,219	16,09
		MED	0,000	0,419	0,137	10,09
	S kofeinem	RAW	0,000	0,309	0,116	8,50
		FIR	0,000	0,312	0,026	1,92
		EEMD	0,000	0,372	0,120	8,85
		MED	0,000	0,297	0,059	4,31

Tabulka 7.3 – Minimální, maximální a průměrné hodnoty šířky špiček vypočtené u originálního signálu a signálů, které prošly filtrací, pro vápníkový signál a signál kontrakce. PW_{dif} značí procentuální rozdíl šířky od originálního signálu. Kladná změna znamená snížení šířky PW a záporná změna znamená její zvýšení její hodnoty.

Šířka špičky			PW _{min} [s]	PW _{max} [s]	PW _{avg} [s]	PW _{dif} [%]
Vápníkový signál	Kontrolní	RAW	0,202	0,263	0,229	0,00
		FIR	0,198	0,242	0,218	-4,59
		EEMD	0,228	0,269	0,244	6,82
		MED	0,210	0,258	0,233	1,98
	S kofeinem	RAW	0,192	0,900	0,267	0,00
		FIR	0,199	0,322	0,253	-5,26
		EEMD	0,214	0,310	0,258	-3,47
		MED	0,206	0,334	0,265	-0,75

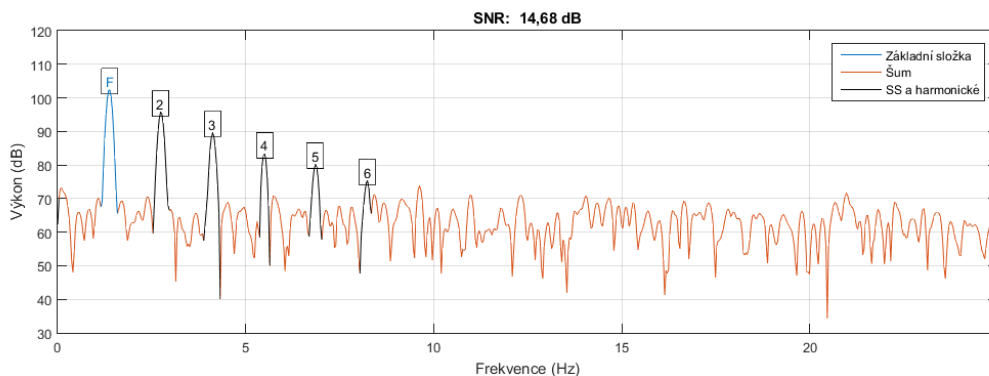
Šířka špičky			PW _{min} [s]	PW _{max} [s]	PW _{avg} [s]	PW _{dif} [%]
AFM signál	Kontrolní	RAW	0,000	0,157	0,079	0,00
		FIR	0,000	0,179	0,090	15,67
		EEMD	0,000	0,157	0,079	0,08
		MED	0,000	0,159	0,080	0,56
	S kofeinem	RAW	0,000	0,181	0,091	0,00
		FIR	0,000	0,192	0,096	6,78
		EEMD	0,000	0,181	0,091	-0,09
		MED	0,000	0,181	0,091	0,48

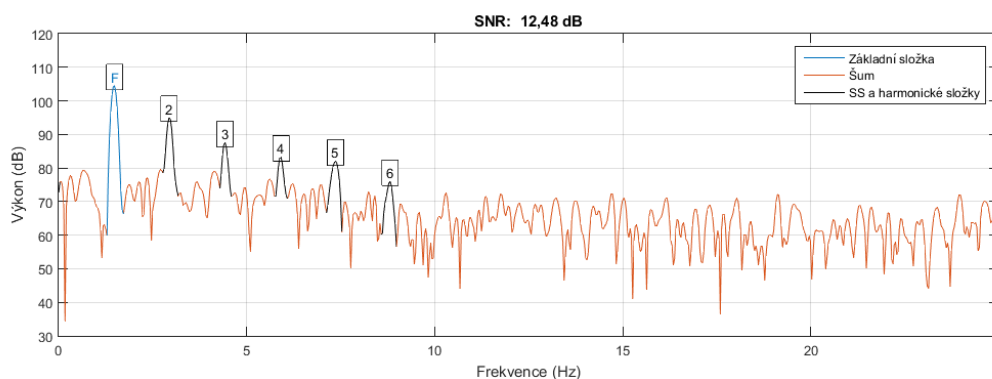
7.5 Ověření filtrace a analýzy signálů při aplikaci kofeinu

V následující fázi byly porovnány kontrolní signály vápníkových signálů a kontrolní signály AFM (originální i filtrované) se signály získanými po aplikaci kofeinu do média buněk dle schématu na Obrázek 6.2 s 30s prodlevou v akvizici. Jako základní médium byl použit modifikovaný Tyrodův roztok se složením 135 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5.4 mM KCl, 0.9 mM MgCl₂; pH 7.4, obsahoval navíc 1,8 mM CaCl₂ and 10 mM glukózu, tyto dvě složky byly přidány až v den měření. Koncentrace aplikovaného kofeinu činila 5 mmol/l. EB byly barveny kalciovým indikátorem Fluo-4 AM ve výsledné koncentraci 1,5 mmol/l.

7.5.1 Analýza změn v signálu kontrakce

Spektrální analýzou s využitím funkce $snr()$ (Signal-to-noise ratio, Matlab 2015b) surových signálů byly získány jednotlivé složky signálu a šumu. Pro kontrolní signál byl vypočten poměr signál ku šumu (dále SNR) 14,68 dB a pro signál získaný po aplikování kofeinu se SNR snížil ještě o 15 %, jak je přesněji zobrazeno ve spektrální analýze na Obrázek 7.24 v další kapitole.

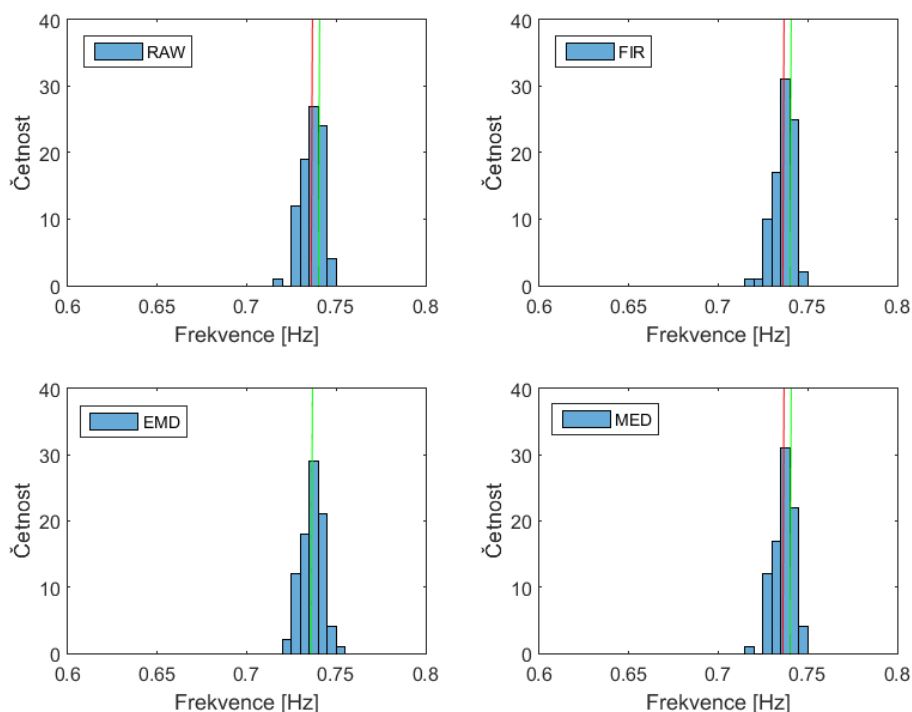




Obrázek 7.24 – Spektrum kontrolního signálu (nahore) a testovacího signálu po aplikaci kofeinu (dole). Základní harmonická složka je označena F a vyšší harmonické složky signálu čísly.

Šum, vzhledem k jeho vlastnostem a úrovni, má vliv na všechny skupiny rozměřených parametrů. Částečně ovlivňuje pozici špiček signálů, v některých případech ovlivňuje přesnost detekce počátečních a koncových bodů na pozicích t_0 a t_{100} a také bodů umístěných v signálu s nízkou úrovní amplitudy – t_{80} , t_{90} . V jiném případě, u signálů pořízených metodou AFM, kde je šum velmi malý, může být naopak aplikování některých typů filtrací nevhodným krokem. A to vzhledem k projevům filtrací, které způsobí zkreslení originálního signálu. Příkladem může být rozšíření špiček anebo mírné zvlnění signálu. Četnosti vypočtených frekvencí T_n jsou znázorněny na obrázku (vlevo) formou histogramu. Dvěma svislicemi je pak vyznačena průměrná hodnota a nejčastěji vyskytující se hodnota frekvence. Hodnoty jsou vyčísleny na tomtéž obrázku (vpravo), navíc jsou doplněny o další parametry.

Pro kontrolní signál byly pro jednotlivé signály získány četnosti detekovaných frekvencí FP . Ty jsou zobrazeny formou histogramů na Obrázek 7.25. V grafech jsou vyznačeny svislicemi průměrná hodnota FP_{avg} a nejčastější hodnota FP_{mode} . Hodnoty jsou vyjádřeny číselně v Tabulka 7.4.

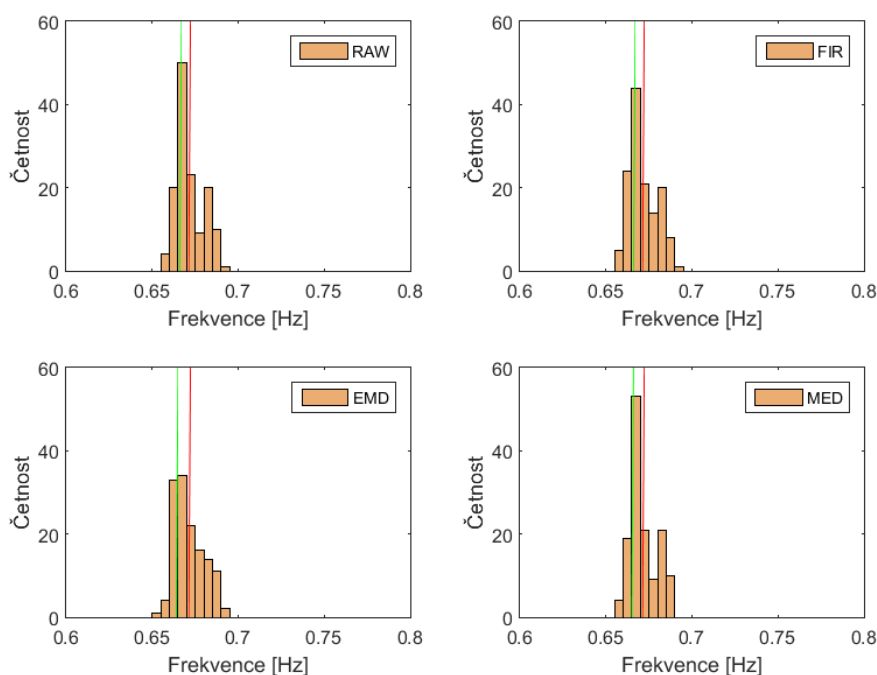


Obrázek 7.25 – Četnosti detekovaných frekvencí špiček kontrolního AFM signálu vynesené formou histogramu. Vypočtená průměrná hodnota frekvencí je zobrazena červenou svislicí, nejčastější hodnota zelenou.

Tabulka 7.4 – Statistické hodnocení detekovaných frekvencí ve spektru frekvencí špiček pro originální signál a signály po provedené filtraci.

Filtrace/Parametr	FP _{avg} [Hz] (kontrolní)	FP _{mode} [Hz] (kontrolní)	FP _{min} [Hz] (kontrolní)	FP _{max} [Hz] (kontrolní)	FP _{var} [Hz] (kontrolní)	FP _{std} [Hz] (kontrolní)
RAW	0,736	0,740	0,719	0,748	306,27*10 ⁻³	5,53*10 ⁻³
FIR	0,736	0,740	0,719	0,748	305,46*10 ⁻³	5,52*10 ⁻³
EEMD	0,736	0,736	0,720	0,750	337,09*10 ⁻³	5,81*10 ⁻³
MED	0,736	0,740	0,719	0,748	270,23*10 ⁻³	5,20*10 ⁻³

Obdobný postup byl proveden u signálu získaného po aplikaci kofeinu. Výsledky jsou opět vizualizovány (Obrázek 7.26) a zobrazeny číselně (Tabulka 7.5).



Obrázek 7.26 – Četnosti detekovaných frekvencí špiček AFM signálu získaného po aplikaci kofeinu vynesené formou histogramu. Vypočtená průměrná hodnota frekvencí je zobrazena červenou svislicí, nejčastější hodnota zelenou.

Tabulka 7.5 – Spektrum frekvencí špiček FP u signál získaný po aplikaci kofeinu.

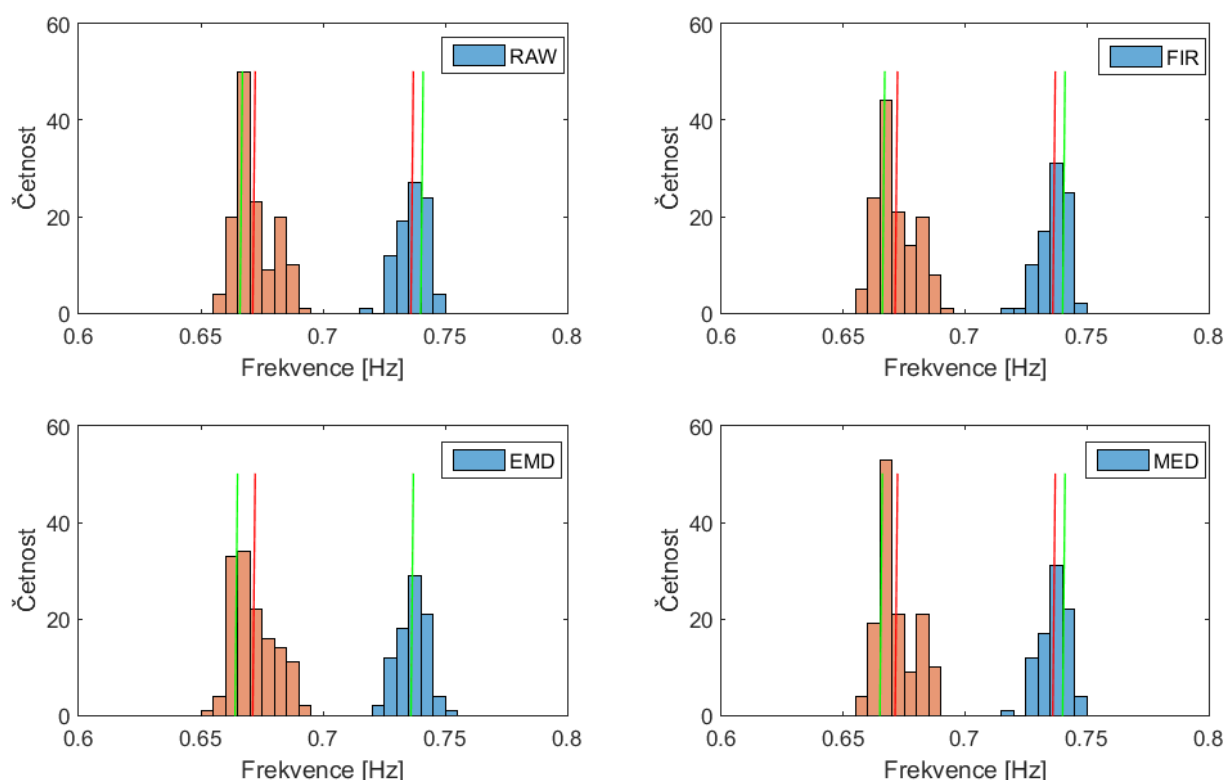
Filtrace/Parametr	FP _{avg} [Hz] (s kofeinem)	FP _{mode} [Hz] (s kofeinem)	FP _{min} [Hz] (s kofeinem)	FP _{max} [Hz] (s kofeinem)	FP _{var} [Hz] (s kofeinem)	FP _{std} [Hz] (s kofeinem)
RAW	0,671	0,666	0,657	0,691	659,22*10 ⁻³	8,11*10 ⁻³
FIR	0,671	0,666	0,656	0,691	676,36*10 ⁻³	8,22*10 ⁻³
EEMD	0,671	0,664	0,654	0,695	766,53*10 ⁻³	8,76*10 ⁻³
MED	0,671	0,665	0,656	0,690	658,13*10 ⁻³	8,11*10 ⁻³

Změny, které po aplikaci kofeinu ve spektru frekvencí špiček nastaly, charakterizuje Tabulka 7.6. Vychází z výpočtů provedených s využitím hodnot uvedených v tabulkách Tabulka 7.4 a Tabulka 7.5. U vypočtených frekvencí špiček byly vypočteny rozdíly mezi frekvencemi špiček kontrolního signálu a signálu získaného po aplikaci kofeinu. Hodnoty rozdílu byly vztaženy k hodnotám frekvencí kontrolního signálu a vyjádřeny byly v procentech.

Tabulka 7.6 – Změny, které nastaly ve spektru frekvencí detekovaných špiček. Změny jsou vyjádřeny procentuálně a jsou vztaheny k hodnotám kontrolního signálu. Kladné hodnoty vyjadřují pokles FP.

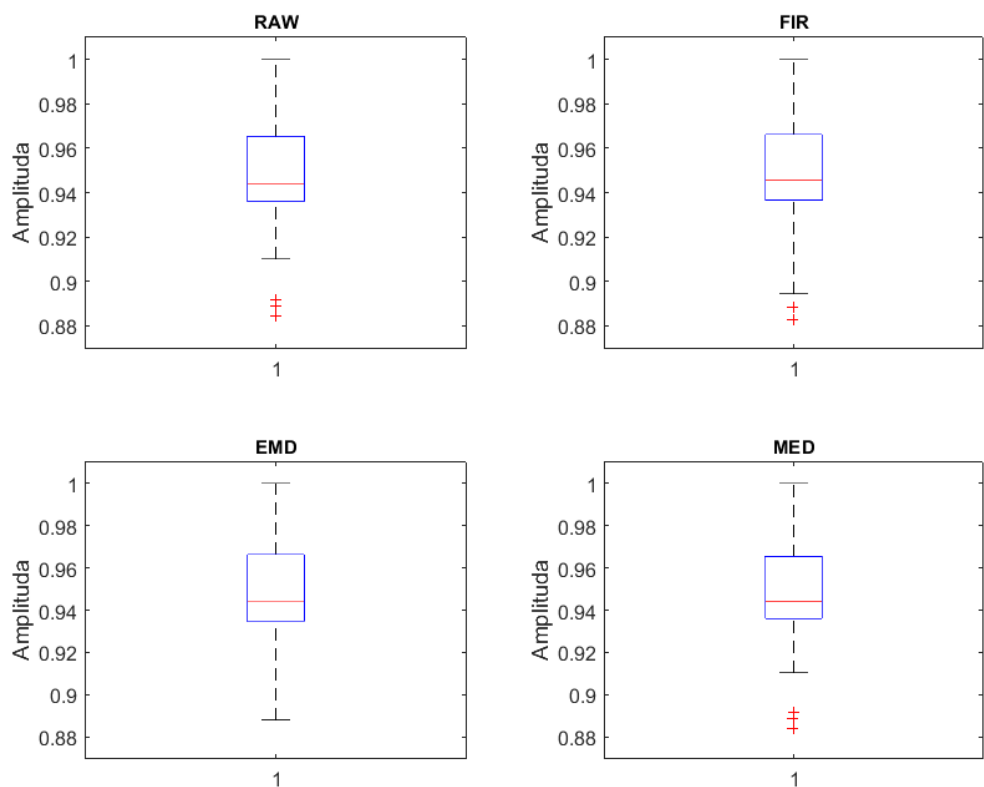
Filtrace/Parametr	FP _{avg} [%]	FP _{mode} [%]	FP _{var} [%]	FP _{std} [%]
RAW	-8,83	-10,00	115,24	46,65
FIR	-8,83	-10,00	121,42	48,91
EEMD	-8,83	-9,78	127,40	50,77
MED	-8,83	-10,14	143,54	55,96

Zhruba desetiprocentní změny se projeví ve frekvenci, mnohem větší v rozptylu hodnot. Posun ve frekvencích je patrný ze zobrazených histogramů (Obrázek 7.27).

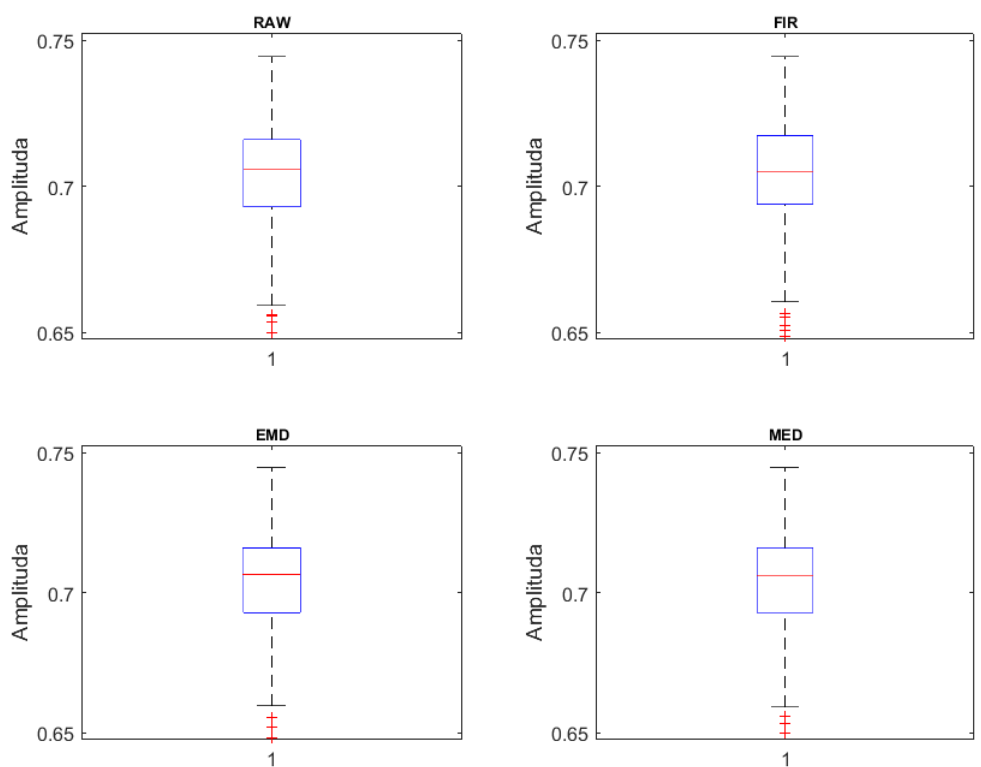


Obrázek 7.27 – Histogramy vyjadřující četnost detekovaných frekvencí špiček ve srovnání kontrolního signálu (modrá) a signálu získaného po aplikaci kofeinu (oranžová) zvlášť po provedení jednotlivých typů filtrací. Vypočtené průměrné hodnoty frekvencí špiček jsou zobrazeny červenou vvislicí. Zelenou vvislicí jsou detekované nejčastější frekvence.

V další fázi byly provedeny analýzy získaných maximálních hodnot detekovaných špiček PA. Amplitudová variabilita detekovaných špiček je znázorněna formou krabicových grafů na Obrázek 7.28 a Obrázek 7.29, ze kterých jsou pro kontrolní signál a signál získaný po aplikaci kofeinu patrný pokles rozdílu úrovní signálů a odlišné rozložení hodnot pro signály získané po jednotlivých filtracích. Jejich statistika je číselně v Tabulka 7.7.



Obrázek 7.28 – Rozložení získaných maxim detekovaných špiček PA v kontrolním signálu vyjádřené pomocí krabicových grafů. Krabicové grafy ukazují nejnižší a nejvyšší hodnotu amplitudy, medián všech hodnot a variabilitu hodnot s ohraničením.

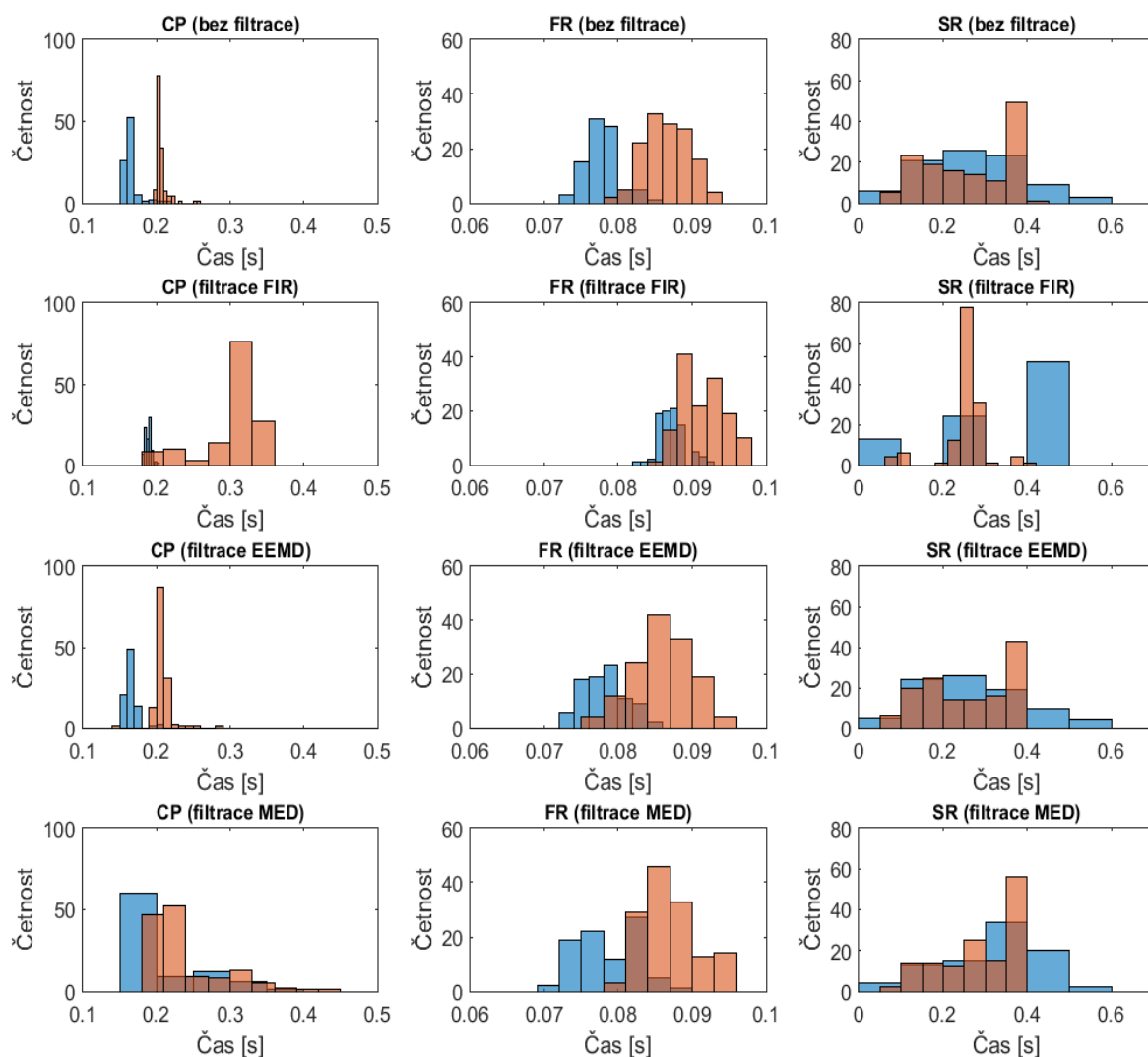


Obrázek 7.29 – Rozložení získaných maxim detekovaných špiček PA v signálu získaném po aplikaci kofeinu vyjádřené pomocí krabicových grafů. Krabicové grafy ukazují nejnižší a nejvyšší hodnotu amplitudy, medián všech hodnot a variabilitu hodnot s ohraničením.

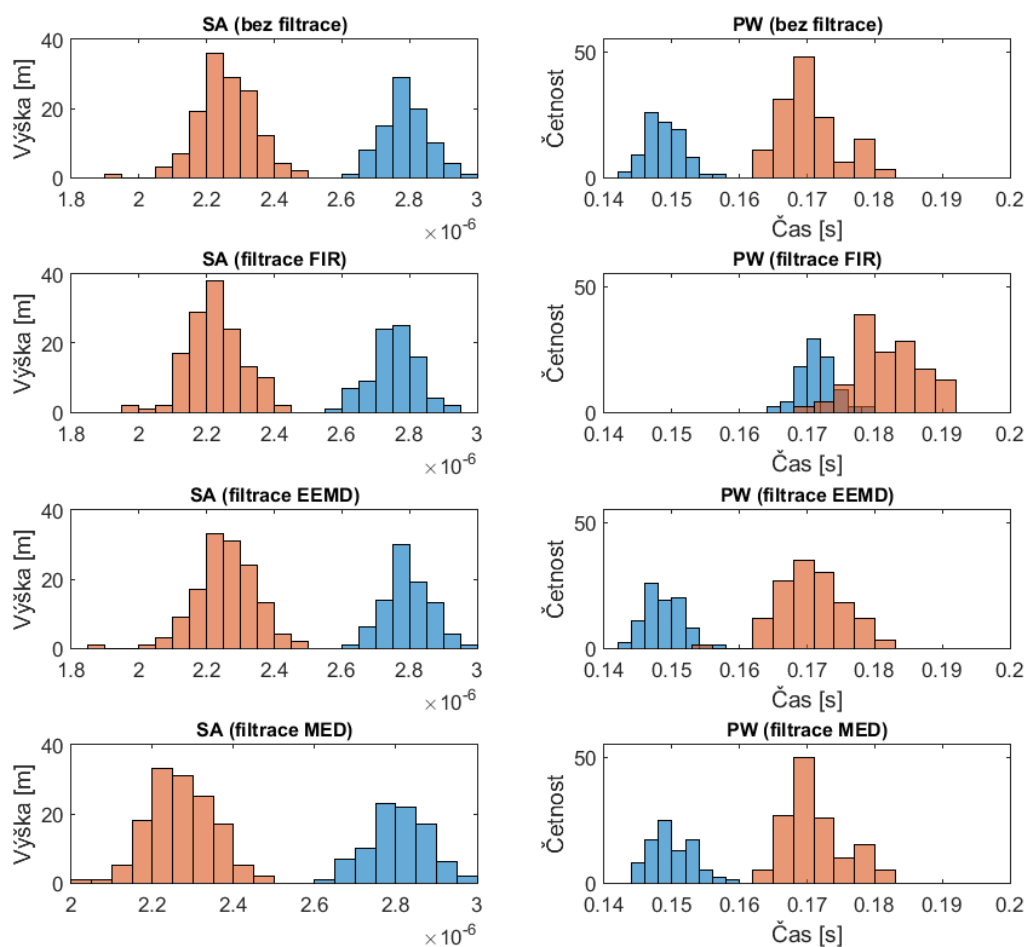
Tabulka 7.7 – Statistika maximálních hodnot detekovaných špiček v kontrolním signálu a signálu získaném po aplikaci kofeinu. V tabulce je vyjádřena průměrná, nejčastější hodnota, rozptyl hodnot a směrodatná odchylka. PA_{dif} následně vyjadřuje procentuální rozdíl mezi úrovní kontrolního signálu a signálu získaného po aplikaci kofeinu. Přibližně 25% rozdíl vyjadřuje úroveň poklesu průměru max. hodnot špiček.

Filtr./ Par.	PA_{avg} [-] (kontrolní)	PA_{mode} [-] (kontrolní)	PA_{avg} [-] (kofein)	PA_{mode} (kofein)	PA_{dif} [%]	PA_{var} [-] (kontrolní)	PA_{std} [-] (kontrolní)	PA_{var} [-] (kofein)	PA_{std} [-] (kofein)
RAW	0,950	0,884	0,702	0,632	-24,8	$0,60 \cdot 10^{-3}$	$24,48 \cdot 10^{-3}$	$1,10 \cdot 10^{-3}$	$33,16 \cdot 10^{-3}$
FIR	0,951	0,882	0,702	0,631	-24,9	$0,61 \cdot 10^{-3}$	$24,49 \cdot 10^{-3}$	$1,12 \cdot 10^{-3}$	$33,41 \cdot 10^{-3}$
EEMD	0,949	0,888	0,702	0,633	-24,7	$0,59 \cdot 10^{-3}$	$24,25 \cdot 10^{-3}$	$1,10 \cdot 10^{-3}$	$33,22 \cdot 10^{-3}$
MED	0,950	0,884	0,701	0,632	-24,9	$0,60 \cdot 10^{-3}$	$24,50 \cdot 10^{-3}$	$1,10 \cdot 10^{-3}$	$33,21 \cdot 10^{-3}$

Funkční parametry CP , FR , SR a PW získané po rozměření kontrolního signálu a signálu získaného po aplikaci kofeinu byly analyzovány obdobně jako frekvenční a amplitudové parametry FP a PA . Výsledky jsou zobrazeny ve společných grafech formou histogramů četností zvlášť pro jednotlivé funkční parametry.

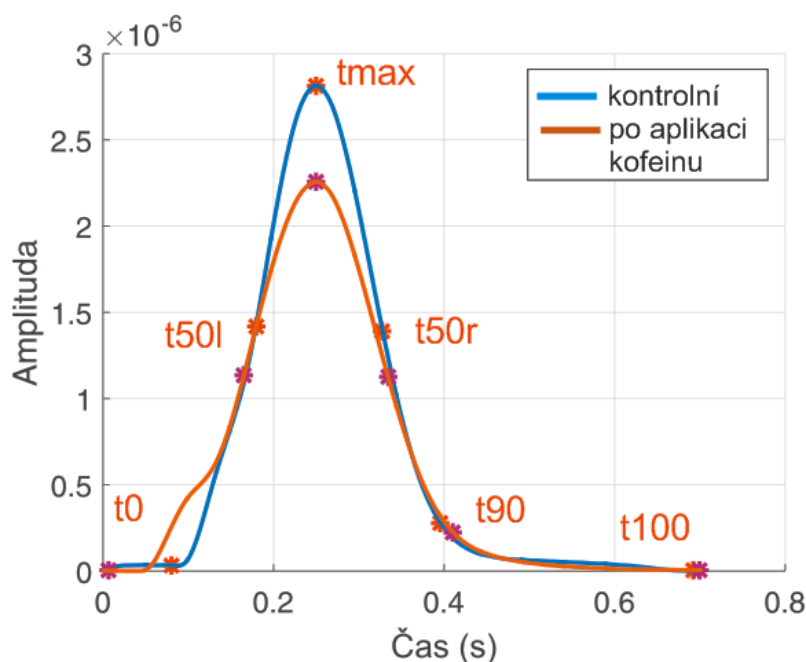


Obrázek 7.30 - Společný histogram znázorňující rozložení četností parametrů CP , FR , SR a PW vždy v porovnání parametrů vycházejících z kontrolního signálu (modrá) a ze signálu získaného po aplikaci kofeinu (oranžová).



Obrázek 7.31 - Společný histogram znázorňující rozložení četností parametrů CP, FR, SR a PW vždy v porovnání parametrů vycházejících z kontrolního signálu (modrá) a ze signálu získaného po aplikaci kofeinu (oranžová).

Zprůměrování všech cyklů kontrakce u kontrolního signálu a u signálu získaného po aplikaci kofeinu byl získán průměrný signál kontrakce před a po aplikaci kofeinu. Tato dvojice cyklů je zobrazena na Obrázek 7.32. V obrázku jsou znázorněny také stěžejní body detekované při rozměřování t_0 , t_{50} (nalevo a napravo) t_{\max} , t_{90} a t_{100} . Vypočtené funkční parametry jsou uvedeny číselně v Tabulka 7.8.



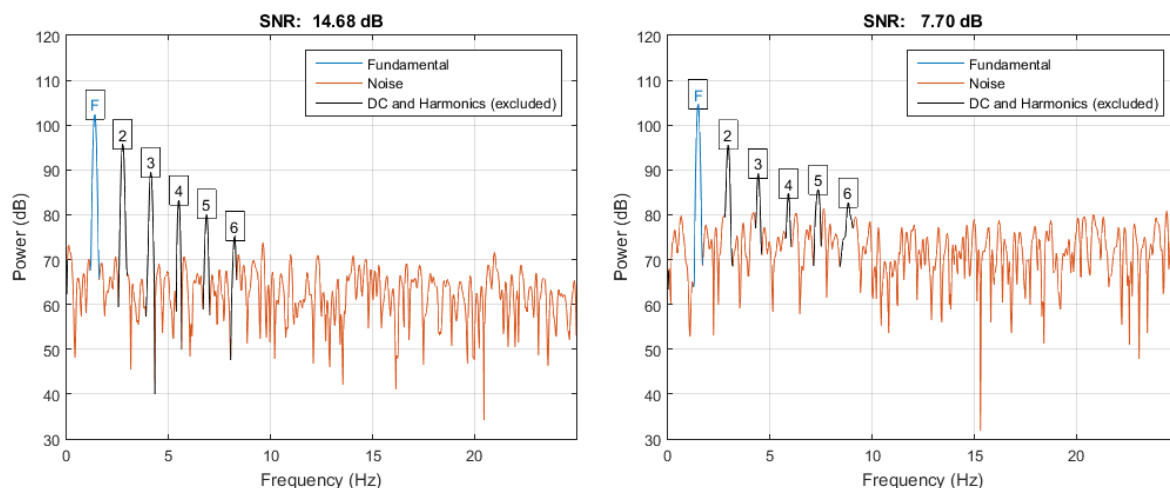
Obrázek 7.32 – Průměrný signál kontrakce před a po aplikaci kofeinu. Jedná se o filtrovaný zprůměrovaný signál, který prošel procesem filtrace metody EEMD. V obrázku jsou vyznačeny detekované průměrné stěžejní body t_0 , t_{50l} a t_{50r} , t_{max} , t_{90} a t_{100} . Z obrázku jsou patrné změny, které vyvolal vliv kofeinu. Změny se projeví ve tvaru a amplitudě signálu. Amplituda je vyjádřena ve změnách výšky v μm u výškového signálu AFM.

Tabulka 7.8 – Výsledné procentuálně vyjádřené změny funkčních parametrů, které nastaly po aplikaci kofeinu. Kladné hodnoty znamenají zvýšení hodnot parametrů oproti kontrolnímu signálu. Z této tabulky a Obrázek 7.32 je patrné velmi mírné zvětšení šířky cyklu, velmi malé protažení v relaxační fázi (RP) a výrazné protažení fáze kontrakce (CP).

Filtr./Par.	CP [%]	RP [%]	RP90 [%]	PW [%]
RAW	26,0	-10,0	-8,3	14,6
FIR	61,2	-4,5	-4,9	5,8
EEMD	25,2	-5,2	-8,8	14,5
MED	20,0	-9,7	-8,5	14,5

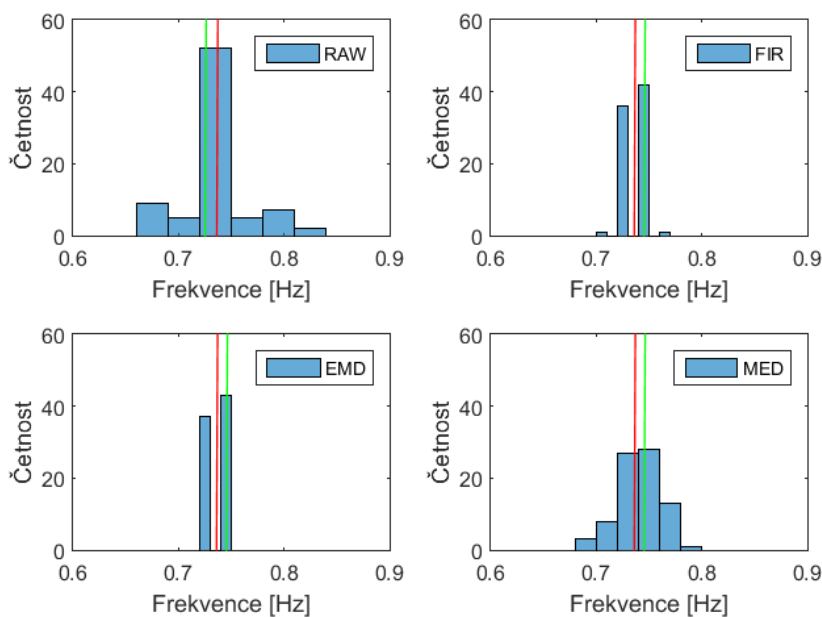
7.5.2 Analýza změn u signálu vápníkových transientů

Spektrální analýzou s využitím funkce $snr()$ (Signal-to-noise ratio, Matlab 2015b) surových signálů byly získány jednotlivé složky signálu a šumu. Pro kontrolní signál byl získán SNR 14,68 dB a pro signál po aplikaci kofeinu 7,70 dB. Zde je oproti AFM signálu, kdy byl pokles zhruba 2 dB pokles výrazný. Spektrální analýza je zobrazena na Obrázek 7.33.



Obrázek 7.33 - Spektrum kontrolního signálu vápníkových transientů (nahore) a testovacího signálu po aplikaci kofeinu (dole). Základní harmonická složka je označena F a vyšší harmonické složky signálu čísly.

Spektrum frekvencí detekovaných špiček u kontrolního signálu FP je graficky zobrazeno na Obrázek 7.34 formou histogramu, kde s pomocí četností jsou vyjádřeny jednotlivé detekované frekvence. Číselně jsou statistiky získaných hodnot vyjádřeny v Tabulka 7.9.

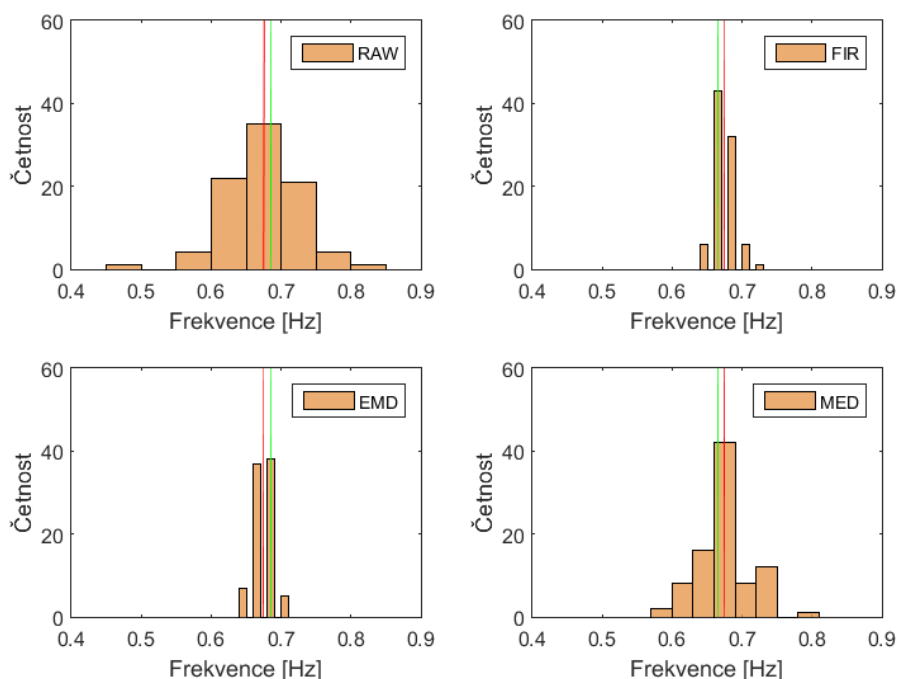


Obrázek 7.34 – Četnost detekovaných frekvencí spektra špiček kontrolního signálu vápníkových transientů. Vypočtená průměrná hodnota frekvencí je zobrazena červenou svislicí, nejčastější hodnota zelenou.

Tabulka 7.9 – Číselné vyjádření statistik spektra detekovaných frekvencí u kontrolního signálu - průměrné, nejčastější, minimální a maximální hodnoty frekvencí a jejich rozptyl se směrodatnou odchylkou.

Filtre/Parametr	FP _{avg} [Hz] (kontrolní)	FP _{mode} [Hz] (kontrolní)	FP _{min} [Hz] (kontrolní)	FP _{max} [Hz] (kontrolní)	FP _{var} [Hz] (kontrolní)	FP _{std} [Hz] (kontrolní)
RAW	0,736	0,725	0,665	0,826	96,4*10 ⁻³	31,1*10 ⁻³
FIR	0,736	0,745	0,705	0,765	12,3*10 ⁻³	11,0*10 ⁻³
EEMD	0,736	0,745	0,725	0,745	10,2*10 ⁻³	10,1*10 ⁻³
MED	0,736	0,745	0,685	0,786	44,1*10 ⁻³	21,1*10 ⁻³

Obdobně je tomu u signálu získaného po aplikaci kofeinu. Spektrum frekvencí detekovaných špiček FP je graficky zobrazeno na Obrázek 7.35 formou histogramu, kde s pomocí četností jsou vyjádřeny jednotlivé detekované frekvence. Číselně jsou statistiky získaných hodnot vyjádřeny v Tabulka 7.10 Tabulka 7.9.



Obrázek 7.35 – Četnost detekovaných frekvencí spektra špiček signálu vápníkových transientů, který byl získán po aplikaci kofeinu. Vypočtená průměrná hodnota frekvencí je zobrazena červenou svislicí, nejčastější hodnota zelenou.

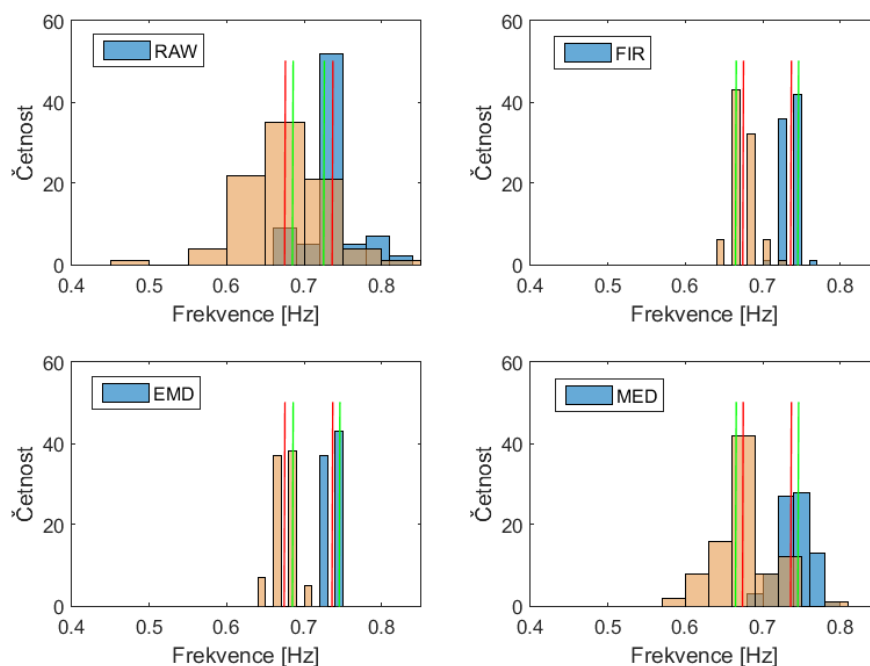
Tabulka 7.10 – Číselné vyjádření statistik spektra detekovaných frekvencí u signálu po aplikaci kofeinu - průměrné, nejčastější, minimální a maximální hodnoty frekvencí a jejich rozptyl se směrodatnou odchylkou.

Filtre/Parametr	FP _{avg} [Hz] (s kofeinem)	FP _{mode} [Hz] (s kofeinem)	FP _{min} [Hz] (s kofeinem)	FP _{max} [Hz] (s kofeinem)	FP _{var} [Hz] (s kofeinem)	FP _{std} [Hz] (s kofeinem)
RAW	0,675	0,685	0,463	0,846	30,1*10 ⁻³	54,9*10 ⁻³
FIR	0,674	0,666	0,645	0,725	2,4*10 ⁻³	15,6*10 ⁻³
EEMD	0,674	0,685	0,645	0,705	2,1*10 ⁻³	14,7*10 ⁻³
MED	0,674	0,665	0,584	0,786	13,65*10 ⁻³	36,9*10 ⁻³

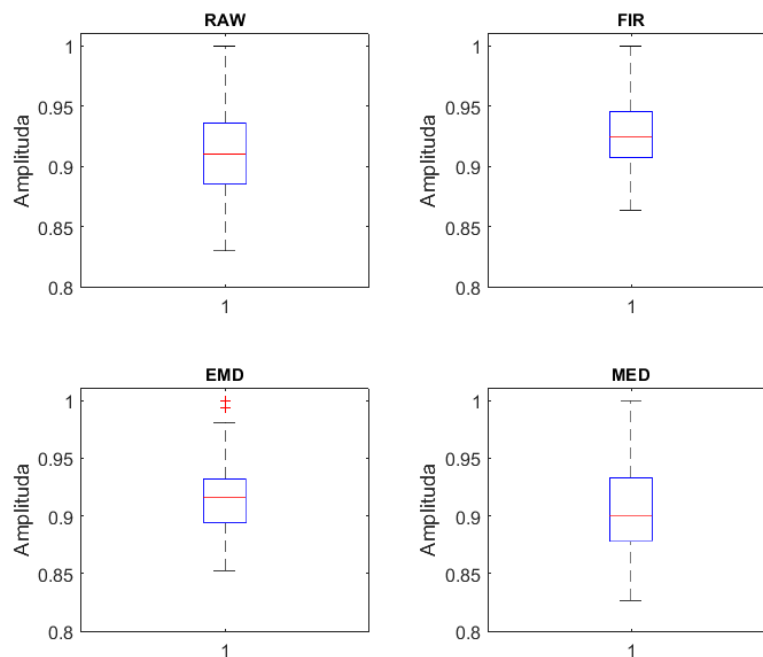
Změny, které nastaly po aplikaci kofeinu jsou patrné z histogramů četností detekovaných frekvencí (Obrázek 7.26) a vyjádřeny číselně v Tabulka 7.11.

Tabulka 7.11 – Procentuální rozdíl mezi vypočtenými průměrnými, nejčastějšími frekvencemi a rozptylem frekvencí. Hodnoty FP_{avg} a FP_{mode} ukazují pokles frekvencí oproti kontrolnímu signálu, rozptyl hodnot ve spektru detekovaných frekvencí se zvětšil.

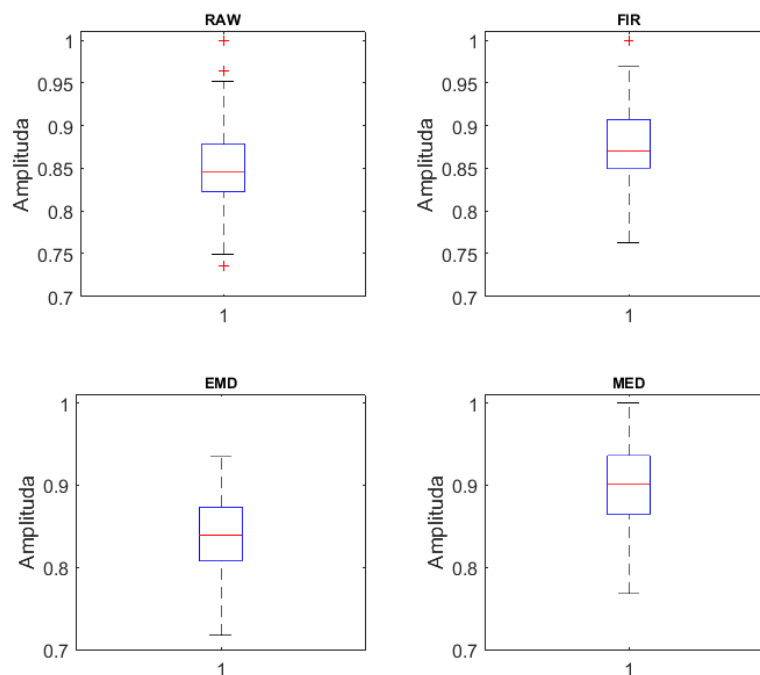
Filtre/Parametr	FP _{avg} [%]	FP _{mode} [%]	FP _{var} [%]	FP _{std} [%]
RAW	-8,29	-5,52	68,78	76,53
FIR	-8,42	-10,60	80,49	41,82
EEMD	-8,42	-8,05	79,41	45,54
MED	-8,42	-10,74	69,05	74,88



Obrázek 7.36 – Histogramy četností detekovaných frekvencí ze spektra frekvencí špiček pro kontrolní signál (modře) a signál s aplikací kofeinu (žlutě). Průměrné hodnoty jsou vyznačeny červenou svislicí a nejčastější hodnoty zelenou svislicí.



Obrázek 7.37 - Rozložení získaných maxim detekovaných špiček PA v signálu získaném u kontrolního vápníkového signálu vyjádřené pomocí krabicových grafů. Krabicové grafy ukazují nejvyšší a nejnižší hodnotu amplitudy, medián všech hodnot a variabilitu hodnot s ohraničením.

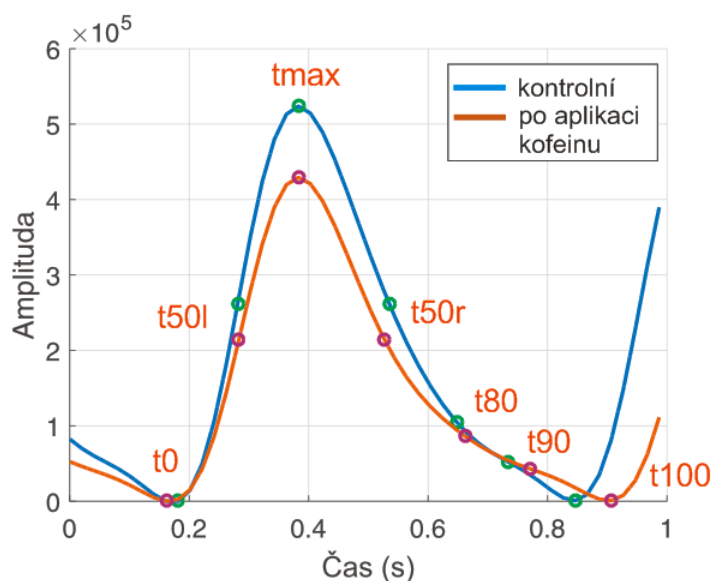


Obrázek 7.38 - Rozložení získaných maxim detekovaných špiček PA ve vápníkovém signálu získaném po aplikaci kofeinu vyjádřené pomocí krabicových grafů. Krabicové grafy ukazují nejnížší a nejvyšší hodnotu amplitudy, medián všech hodnot a variabilitu hodnot s ohraničením.

Tabulka 7.12 - Statistika maximálních hodnot detekovaných špiček v kontrolním signálu a signálu získaném po aplikaci kofeinu u vápníkového signálu. V tabulce je vyjádřena průměrná, nejčastější hodnota, rozptyl hodnot a směrodatná odchylka. PA_{dif} následně vyjadřuje procentuální rozdíl mezi úrovní kontrolního signálu a signálu získaného po aplikaci kofeinu. Přibližně 20-30% rozdíl v závislosti na použitém typu filtrace rozdíl vyjadřuje úroveň nárůstu (vzhledem k záporným hodnotám) průměrných max. hodnot špiček.

Filtr./ Par.	PA_{avg} [-] (kontrolní)	PA_{mode} [-] (kontrolní)	PA_{avg} (kofein)	PA_{mode} (kofein)	PA_{dif} [%]	PA_{var} [-] (kontrolní)	PA_{std} [-] (kontrolní)	PA_{var} [-] (kofein)	PA_{std} [-] (kofein)
RAW	0,743	0,676	0,913	0,871	-22,782	$1,40 \cdot 10^{-3}$	$37,76 \cdot 10^{-3}$	$2,24 \cdot 10^{-3}$	$47,58 \cdot 10^{-3}$
FIR	0,755	0,703	0,941	0,814	-24,59	$0,87 \cdot 10^{-3}$	$29,48 \cdot 10^{-3}$	$2,07 \cdot 10^{-3}$	$45,50 \cdot 10^{-3}$
EEMD	0,746	0,695	0,901	0,765	-20,85	$0,97 \cdot 10^{-3}$	$31,28 \cdot 10^{-3}$	$1,87 \cdot 10^{-3}$	$43,24 \cdot 10^{-3}$
MED	0,736	0,673	0,963	0,879	-30,86	$1,52 \cdot 10^{-3}$	$39,05 \cdot 10^{-3}$	$2,75 \cdot 10^{-3}$	$52,44 \cdot 10^{-3}$

V poslední fázi, obdobně jakou u signálů kontrakce, byly rozměřeny funkční parametry. Změny jsou kvantitativně vyjádřeny v Tabulka 7.13. Změny jsou znázorněny také na Obrázek 7.39, kde je současně vyobrazen průměrný cyklus vápníkových transientů a průměrný cyklus signálů vápníkových transientů po aplikování kofeinu. Na signálech byly detekovány stěžejní body, ze kterých vychází výpočty.



Obrázek 7.39 - Průměrný signál vápníkových transientů před a po aplikaci kofeinu. Jedná se o filtrovaný zprůměrovaný signál, který prošel nejdříve procesem filtrace metodou EEMD. V obrázku jsou vyznačeny detekované průměrné stěžejní body t_0 , t_{50l} a t_{50r} , t_{max} , t_{90} , t_{80} a t_{100} . Z obrázku jsou patrné změny, které vyvolal vliv kofeinu. Změny se projeví ve tvaru a amplitudě signálu. Amplituda je vyjádřena ve změnách sumy hodnot pixelů v oblasti zájmu (vyjadřující detekovanou změnu fluorescence).

Funkční parametry CP , FR , SR a PW získané po rozměření kontrolního signálu a signálu získaného po aplikaci kofeinu byly analyzovány obdobně jako frekvenční a amplitudové parametry FP a PA . Výsledky změn, které nastávají po aplikaci kofeinu, jsou zobrazeny číselně v Tabulka 7.13.

Tabulka 7.13 – Výsledné, procentuálně vyjádřené změny funkčních parametrů, které nastaly po aplikaci kofeinu. Záporné hodnoty značí snížení hodnot oproti kontrolnímu signálu, zatímco kladné jejich zvýšení. Z tabulky a Obrázek 7.39 jsou patrné změny - snížení šířky špiček a přitom dochází k protažení ve fázi TtP a k výraznému protažení RT fáze.

Filtr./Par.	TtP [%]	FR [%]	SR [%]	RT [%]	RT80 [%]	RT90 [%]	PW [%]
RAW	25,1	-11,5	-7,23	9,3	52,9	34,1	-16,7
FIR	3,2	-3,8	16,0	13,0	14,0	21,4	-15,8
EEMD	3,7	-4,2	12,0	13,4	15,1	22,9	-5,5
MED	16,8	-6,6	13,1	17,7	32,6	35,0	-13,5

7.6 Diskuse k výsledkům

Signály kontrakce a signály vápníkových transientů byly získány při společném experimentu. Po načtení byly synchronizovány (upraveny na shodnou délku) a prošly základními úpravami do formátu vhodného k další analýze. Originální signály prošly filtrace třemi odlišnými způsoby filtrace. Použití odlišných filtrací a jejich porovnání měly za úkol poukázat na potřebu provedení filtrace, která bývá v publikacích při zpracování vápníkových transientů anebo AFM silových signálů u iPSC kardiomyocytů (iPSC-CM) a vybrat vhodný typ filtrace.

Filtrace má u signálů zajistit kvalitní odstranění aditivního šumu. To má za následek snadnější a přesnější lokalizaci stěžejních bodů, které následně slouží k rozměření a získání funkčních parametrů ze signálů. Filtrace však mohou působit pro dané potřeby negativně - mohou rozšířit šířku špiček, což souvisí s odstraněním vyšších harmonických, které v sobě strmé změny obsahují. Dalším negativním efektem může být mírné zvlnění signálu, které pak způsobuje detekci bodů určených pro rozměrování

umístěných na nízké úrovni signálu (většinou na konci doby relaxace u signálů kontrakce a na konci vápníkových cyklů). V neposlední řadě může jít o potlačení malých zámkitů v biologickém signálu frekvenčně a charakterově blízkých aditivnímu šumu.

Lineární filtrace s FIR filtrem a mediánová filtrace byly zvoleny účelně, neboť jde o obecně známé a často používané filtrace pro odstranění šumu u biologických signálů. Šum, který je v signálu vápníkových transientů přítomen, pochází z procesů spojených se získáváním obrazů obrazovým snímačem a elektronikou kamery. Zejména se jedná o čtecí a termální šum detektoru. Šum přítomný v signálu je vysokofrekvenčního charakteru. Lineární filtrace zajišťuje filtraci na základě znalosti spektrální charakteristiky signálu a slouží k potlačení určitých spektrálních složek. Je proto vhodný pro filtraci vysokofrekvenčního šumu. Mediánový filtr umožňuje vyhlazení signálů, odstraněním lokálních rychlých výkyvů v signálu. Filtrace metodou EEMD je naopak metodou relativně novou, používanou v náročných případech a splňuje uvedené požadavky. Byla proto zvolena jako perspektivní varianta filtrace, která byla taktéž zahrnuta do testů.

K hodnocení vlivu (pozitiv a negativ) aplikovaných filtrací byly použity tyto kroky:

- porovnání úrovně filtrace spektrální analýzou a vypočtením SNR,
- detekci špiček signálů a hodnocením vlivu filtrací na spektra detekovaných časových vzdáleností mezi špičkami a detekovaná maxim špiček.
- na základě hodnocení vlivu filtrace na rozměřené funkčních parametry a jejich statistické výstupy.

7.6.1 Potlačení šumu

Z ukázek signálu a provedených spektrálních analýz je patrná vysoká úroveň šumu u signálů vápníkových transientů, jednak u kontrolního signálu, zejména pak u vápníkového signálu po získání po aplikaci kofeinu, kdy byl zaznamenán pokles SNR téměř na poloviční úroveň. Použitím filtračních metod u vápníkového signálu bylo dosaženo zlepšení SNR až o 98 % v případě EEMD u signálu získaného po aplikaci kofeinu a o 55 % v případě kontrolního signálu vápníkových transientů. Obdobné výsledky vykazuje také lineární filtrace. U mediánové filtrace není zlepšení SNR u obou typů vápníkových signálů tak výrazné. Tam je maximální dosažené zlepšení SNR o 37 % oproti originálnímu signálu. U signálu kontrakce získaného metodou AFM je naopak šum v signálu na minimální úrovni. Aplikací filtračních metod došlo ke zlepšení SNR o pouhé necelé 1 %. Výsledky jsou patrné z hodnot vypočtených poměrů signálu k šumu uvedených v Tabulka 7.1. Z výsledků vyplývá splnění účelu filtrace u signálů vápníkových transientů, jak u kontrolního signálu, tak u signálu získaného po aplikaci kofeinu. U signálů AFM je použití filtrací diskutabilní, a to vzhledem k negativům, které některé typy filtrací přináší.

7.6.2 Negativní vlivy filtračních metoda na užitečný signál

U metody lineární filtrace s FIR filtrem se projevuje výrazné zvlnění AFM signálu a také nastává mírné zúžení šířky špiček. Zvlnění má přímý vliv na přesnost detekce bodů t_{80} , t_{90} a t_{100} potřebných pro rozměření signálu na funkční fáze a získání funkčních parametrů. Příkladem může být bod t_{100} související s ukončením jednoho cyklu signálu, kdy se jedná o koncový bod cyklu. U vápníkových signálů je tento bod t_{100n-1} často společný s počátečním bodem následujícího cyklu t_{100n} . U signálů kontrakce jsou ve většině případů naopak odděleny. Mírné zvlnění se projevuje také u filtrace EEMD, avšak na mnohem nižší úrovni než u lineární filtrace. K tomuto účelu byly provedeny analýzy oddálení hodnot t_0 a t_{100} pro zjištění vlivu zvlnění na užitečný signál a jeho rozměřování pro jednotlivé použité metody filtrace a také byl proveden výpočet šířky špiček, který vykazuje vliv jednotlivých metod filtrací na

hodnocený parametr PW (přímo odpovídající šířce špičky v jeho polovině). Výsledky analýzy vzdálenosti hodnot t_0 a t_{100} jsou uvedeny v Tabulka 7.2. U vápníkových signálů je maximální odchylka bodů t_0 a t_{100} maximálně 4% a vyskytuje se u originálního signálu pouze u signálu získaného po aplikaci kofeinu. U kontrolního signálu vždy t_{100} přesně odpovídá bodu t_0 následujícího cyklu. Odchylky mezi t_0 a t_{100} však vznikají při použití mediánové filtrace u kontrolního signálu. U signálu s kofeinem je posun t_0 a t_{100} patrné také, zde je možné tento posun považovat za důsledek pouze částečné filtrace v oblastech detekce bodů t_0 a t_{100} mediánovou filtrací - ta dokázala odchylku snížit zhruba na polovinu (v porovnání s originálním signálem). Ostatní filtrace byly v tomto případě plně úspěšné a snížily odchylku bodů na nulu. U signálů AFM jsou vzdálenosti t_0 a t_{100} významné. Je to dáno charakterem signálu kontrakce, kde je velká část relaxační fáze (RT) poblíž nulové hodnoty. Zde jsou v Tabulka 7.2 zvýrazněny hodnoty T_{dif} odpovídající odsunutí bodů t_0 a t_{100} , které vznikají uměle vlivem daných filtrací. Je zde patrná odchylka od originálního signálu. Hodnoty T_{dif} vyjadřují procentuální rozdíl změřené vzdálenosti t_0 a t_{100} vztahený k délce cyklů. Kladné hodnoty tedy vyjadřují zkrácení vzdáleností t_0 a t_{100} . Negativní změny jsou patrné u metod lineární filtrace a mediánové filtrace. Co se týče vlivu jednotlivých metod filtrace na změnu šířky špičky u vápníkového signálu, tak se změny projevují u metody lineární filtrace a EEMD filtrace, kdy u kontrolního signálu lineární filtrace šířku špiček mírně rozšiřuje, zatímco EEMD filtrace zužuje. U signálu získaného po aplikaci kofeinu metoda lineární filtrace šířku opět zužuje a filtrace EEMD šířku špičky také zužuje, na rozdíl od prvního případu. Zde je podstatné, že u metody lineární filtrace dochází pouze k zúžení špičky, a to současně v kontrolním, tak v signálu získaném po aplikaci kofeinu. Šířky špiček PW jsou však porovnávány relativně (změna PW mezi kontrolním signálem a signálem po aplikaci kofeinu), takže pokud došlo k zúžení na obou stranách a je v něm vzájemný rozdíl pouze necelé jedno procento hodnot, lze zúžení považovat za zanedbatelné. Naopak u filtrace metodou EEMD nejdříve dochází k rozšíření šířky špiček a následně k jejich zúžení, takže je vzájemný rozdíl výrazný a lze považovat tyto změny šířky špiček za negativní s vlivem na měřený funkční parametr PW . Lineární filtrace naopak ukazuje, že nejméně ze všech filtrací zkresluje šířku špiček u vápníkových signálů. Rozdílné výsledky jsou vidět u signálů kontrakce pořízené metodou AFM.

U signálů jsou šířky špiček mediánovou filtrací a filtrací EEMD ovlivněny nepatrně. Naopak negativní vliv způsobený lineární filtrací, která šířku PW zvětšuje až o 16 %, je výrazný.

7.6.3 Vliv na vzdálenosti detekovaných špiček a jejich maximálních hodnot

Spektrum frekvencí detekovaných špiček FP a spektrum maximálních hodnot špiček PA jsou nejdůležitějšími hodnocenými parametry, které jsou základními hodnocenými parametry i v ostatní literatuře. Vliv šumu anebo naopak negativních vlastností použitých filtrací na FP a PA mají podstatný vliv na hodnocení vlivu testované látky (zde je to konkrétně kofein) a hodnocení celého experimentu. O těchto vlivech na FP u signálů kontrakce (signálů AFM) vypovídají Tabulka 7.4 a Tabulka 7.5. Z výsledků je patrné, že na průměrnou FP (FP_{avg}) nemá vliv ani šum, ani provedené filtrace. Detekci špiček a jejich časové a amplitudové hodnocení lze vykonat s výbornou přesností již u originálních, nefiltrovaných signálech. Zde postrádá úloha provedení filtrace význam. Malé změny se projevují jen v rozptylu a směrodatné odchylce hodnot, jelikož je ale důležitá pouze průměrná hodnota FP , není rozptyl v celku hodnot podstatný. Stejně je tomu u kontrolního signálu i signálu po aplikaci kofeinu. Obdobně je tomu u maximálních hodnot detekovaných špiček PA . Zde se průměrné hodnoty u jednotlivých metod filtrací liší o max. 2 tisíce.

V případě signálů vápníkových transientů je situace stejná, k odchylce u FP_{avg} dochází v maximální míře jedné tisíce Hz. Větší odchylka je patrná u nejčastější hodnoty FP_{mode} . Přestože skupina frekvencí FP má v případě originálního signálu a mediánové filtrace velmi vysoký rozptyl, jsou průměrné frekvence shodné s těmi získanými po lineární filtraci a filtraci metodou EEMD. Lze tedy říci,

že i v případě vápníkových signálů s vysokou úrovní šumu lze v případě potřeby získání průměrné hodnoty FP kroky zahrnující filtraci signálů vynechat, resp. je možné použít libovolný z testovaných metod filtrací. U vápníkových signálů je změna patrná v malé míře u průměrné hodnoty PA , odchylky jsou v setinách hodnot.

Z rozměřených funkčních parametrů je pak patrný negativní rozdíl u metody lineární filtrace u hodnot PW , kde se výrazně odlišuje od ostatních hodnot výše uvedeným vlivem na šířku špiček. Obdobně je patrný výrazný rozdíl v posunu u vypočtené průměrné kontrakční a relaxační fáze, kdy je tento rozdíl opět způsoben zejména výše zmíněnou negativní vlastností přídavného zvlnění k užitečnému signálu.

Za celkově nejvýhodnější metodu filtrace lze považovat metodu EEMD. Mezi její zjištěné nevýhody patří pouze vliv na šířku špiček u vápníkových signálů. Další nevýhodou může být nutné individuální a komplikované nastavení vstupních parametrů filtrace u konkrétních signálů a také výpočetní náročnost. Pozitiva této metody filtrace převyšují její negativa i negativa ostatních porovnávaných metod filtrací.

7.6.4 Vliv kofeinu na funkční parametry

U signálů kontrakce došlo u průměrné hodnoty maximálních hodnot špiček PA aplikací kofeinu k poklesu o 25 % (oproti kontrolnímu signálu). Změny, které nastaly, jsou patrné z Tabulka 7.7 a jsou dobře vidět na Obrázek 7.32. Také došlo ke snížení časových vzdáleností mezi špičkami vyjádřenými spektrem frekvencí FP průměrně o necelých 10 % a v případě porovnání nejčastějších detekovaných hodnot F_{mode} je změna přibližně 11 %. U signálů kontrakce byly dále hodnoceny parametry CP a RP odpovídající kontrakční a relaxační fázi a parametry $RP90$ a šířka špiček PW . Změny jsou opět vyjádřeny procentuálně a vztaženy ke kontrolnímu signálu. Výsledky jsou zobrazeny v Tabulka 7.8. Pro signál prošlý filtrací metodou EEMD jsou patrné tyto změny, které nastaly vlivem aplikace kofeinu:

- u fáze kontrakce došlo k průměrnému rozšíření o 25,2 %,
- u fáze relaxace došlo k průměrnému rozšíření o 5,2 %,
- u související strmější části této fáze – $RT90$ pak v míře 8,8 %,
- u šířky špičky došlo k průměrnému rozšíření o 14,5 %.

Změny jsou vidět na souvisejícím vykreslení zprůměrovaných cyklů signálu na Obrázek 7.32.

U signálů vápníkových transientů došlo ke změnám v průměrné hodnotě spektra amplitud detekovaných špiček PA v rozmezí zhruba 20 až 31 % v závislosti na typu aplikované metody filtrace. Stejně jako je tomu u signálů kontrakce, došlo k poklesu úrovně signálu. U funkčních parametrů dále došlo (dle výsledků s použitou EEMD filtrací) k:

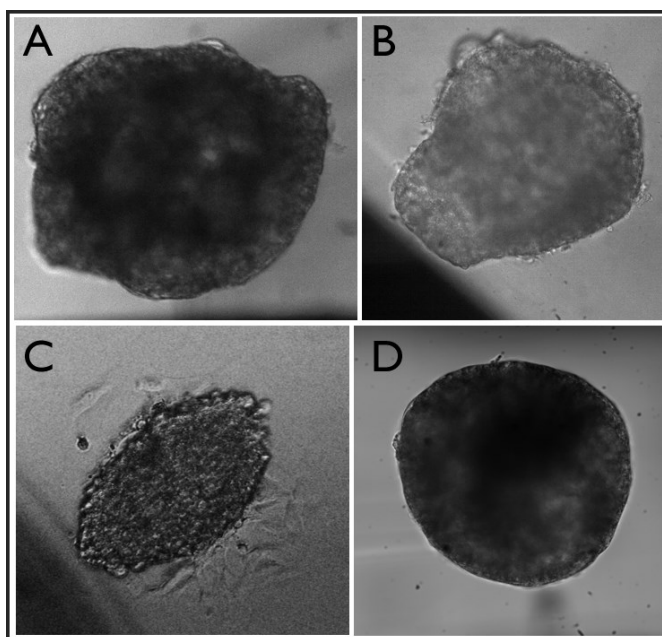
- velmi mírnému roztažení fáze kontrakce CP o 3,7 %,
- velmi mírnému zúžení šířky špiček v jejich polovině o 5,5 %,
- k protažení ve fázi RT odpovídající zpětnému vstřebání a vyplavení vápníkových iontů o 13,4 %, zejména pak k protažení ve fázi mezi 80 a 90 % poklesu úrovně signálu o 15 – 23 %.

Prodloužení času potřebného ke zpětnému vstřebání do sarkoplasmatického retikula a vyplavení z intracelulárního prostředí iontů vápníku v buňkách (prodloužení fáze RT) lze přisuzovat snížení frekvence signálu a snížení tepu měřeného objektu.

8 Praktická část B – Optické měření kontrakce iPSC-CM (EB)

Kapitola popisuje experimentální ověření optické metody měření kontrakce na embryoidních shlucích buněk typu iPSC-CM s využitím jedné optické kamery ve viditelné oblasti světla. Obsahuje popis a vyhodnocení testovaných postupů a praktických realizací za účelem demonstrace optické metody ve více variantách. V současné době je za účelem měření kontrakce EB hojně využívána metoda mikroskopie atomárních sil. Tato kontaktní metoda dokáže zajistit pořízení dlouhodobého stabilního záznamu signálu kontrakce s vysokou vzorkovací frekvencí a vysokým poměrem signál/šum. Optická metoda – metoda s využitím světelné mikroskopie, analýzou obrazové sekvence a signálů – dokáže s využitím popsaných postupů nabídnout alternativní řešení pro snímání kontrakce objektů EB s odlišnými vlastnostmi, spolehlivostí a přesností. Snahou je tak ukázat, jakých výsledků ve srovnání s referenčním AFM, je možné s využitím různých technik u optické metody dosáhnout, poukázat na okolnosti, za kterých optická metoda vykazuje spolehlivost a kladné vlastnosti.

Shluky iPSC-CM kardiomyocytů formované do EB obsahují několik tisíc jednotlivých kardiomyocytů fungujících jako celek. Celek EB (iPSC-CM) tvoří kulovitý objekt, se zploštěním ve vertikálním směru. Kulovitý objekt se postupně zplošťuje s rostoucí fází vývoje [141] a adherováním při kultivaci na povrch misky. Shluk EB v podstatě může existovat jako volný, kdy nemá žádnou vazbu k podložnímu sklíčku či misce, anebo ve formě adherované na misce. V druhém případě je uchycen na spodní straně a jeho okraje se rozrůstají po podložní ploše do stran. Pomocí světelné mikroskopie lze EB ve volné formě pozorovat jako kruhový či oválný objekt se zřetelnou hranicí objektu. Příklady čtyř různých objektů EB, jejichž snímky byly pořízeny světelnou mikroskopií na těle mikroskopu Olympus FV-2000 s kamerou Andor Zyla 5.5, jsou uvedeny na Obrázek 8.1. Snímky A a D obsahují volné objekty, B je mírně přichyceno k misce a u C je patrná pozdní fáze s prorostlou strukturou buněk na misce z hlavního objektu EB do okolí.



Obrázek 8.1 – Snímky EB pořízené mikroskopií ve světlém poli kamerou Andor Zyla 5.5 v rozlišení zhruba 1500 x1500 px se zvětšení objektivem 20X.

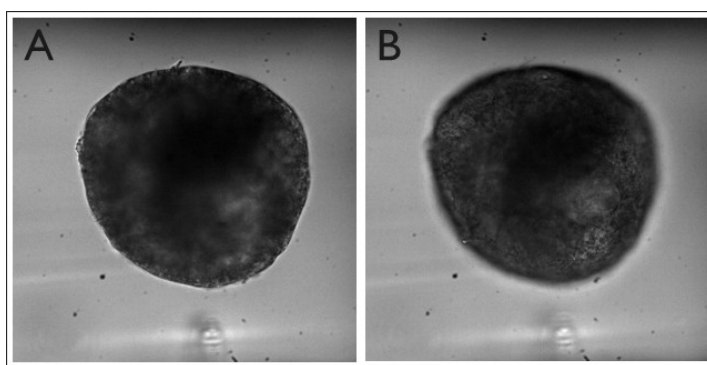
Morfologie EB spolu s technikou zobrazení hrají v možnostech uplatnění optických metod kontrakce iPSC-CM velkou roli. Jak už bylo uvedeno v kapitole 2.1, velká řada optických metod měření kontrakce, zejména celé řady variant aplikovaných na izolované srdeční buňky, je zaměřena na detekci

interních změn struktury měřeného objektu a rozlišení těchto změn v čase. Nevýhodnou vlastností EB pro takovéto účely je jejich velikost a velice rozsáhlá a variabilní vnitřní struktura daná velkým počtem jednotlivých kardiomyocytů. Tato struktura oproti izolovaným dospělým kardiomyocytům neobsahuje pravidelné části (proužkování či jiné). Vzhledem k velikosti objektů, při sledování EB závisí rozsah zobrazení struktury na volbě optické roviny – zvětšení objektivu a zaostření mikroskopu. Vnitřní struktura je patrná po krajích, pokud je objekt zaostřen na rovinu, ve které leží objekt na misce (Obrázek 8.4, vlevo). Vnitřní oblast je tak rozmazaná. Při zaostření na středovou a horní část objektu jsou rozmazány okraje. Naopak je v celém objektu patrná vnitřní struktura (Obrázek 8.4, vpravo). Ta se může lišit dle velikosti EB (a s tím spojeným způsobem zobrazení) a v závislosti na formě EB a jeho stáří, což ukazují i patrné rozdíly na

Obrázek 8.1. Záběrem objektivem s menším zvětšením a související velkou rovinou ostrosti by byl objekt zobrazen jako opticky málo propustný, což je patrné ze snímků na

Obrázek 8.1 A a

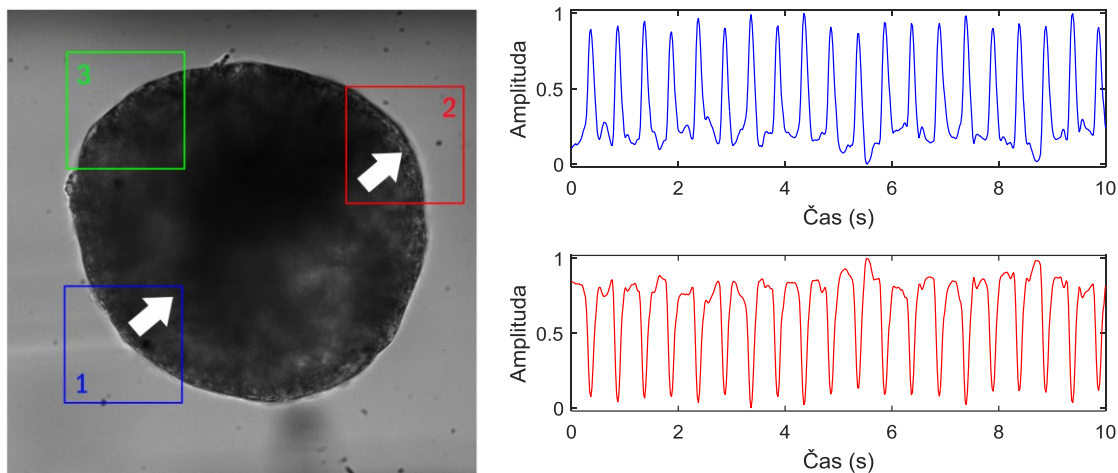
Obrázek 8.1 D.



Obrázek 8.2 – Ukázka shodného objektu jako Obrázek 8.1 D se dvěma odlišnými optickými rovinami ostření. A – objekt je zaostřen na rovinu umístěnou nejbližší podložní misce a vysokou ostrost v tomto případě vykazují hraniční úseky objektu, B – objekt je zaostřen na horní (středovou) část. Hraniční úseky z A jsou rozostřené.

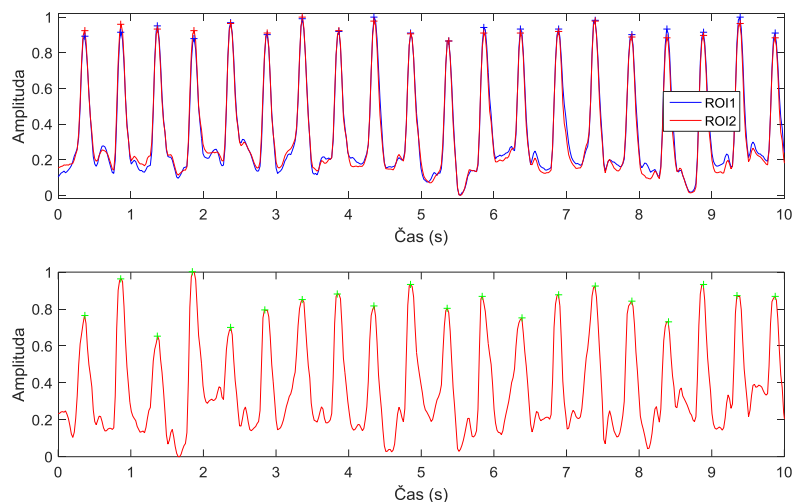
Hlavní uplatnění optických metod měření kontrakce v další části je tak směřováno na možnosti detekce pohybu hranice EB v průběhu kontrakce. Na variantu využívající rozeznání vnitřní struktury a její časové variability s využitím IR laseru, je poukázáno v další části. V podstatě během kontrakce nastávají dva jevy, jak bylo u měřených shluků buněk vyzorováno. Při kontrakci dochází ke smršťování a následnému roztažení do klidové polohy. V ideálním případě by tedy bylo vhodné zacílit analýzu na celý objekt EB (objekt ve vhodném zobrazení, viz Obrázek 8.2 A) na detekci hranice po celé délce a hodnocení její změny délky v čase. Výhodně by mohl být získán signál s vysokým rozlišením, s odezvou hranice maximální délky. Experimentálně však bylo zjištěno, že v EB mohou kontrakci vykazovat jen určité části – kontraktilní centra, takže se objekt může smršťovat nerovnoměrně, resp. různé úseky hranice se mohou smršťovat v různé míře a některé úseky dokonce nevykazují žádný pohyb, což může být následkem částečného přichycení některých oblastí EB k misce. Mimoto se může projevovat jev druhý: V druhém případě může v případě kontrakce nastávat pohyb stranou v rámci celého objektu. Tento případ je demonstrován na Obrázek 8.3. Na Obrázek 8.3 je zobrazen jeden snímek EB kulatého tvaru, s cíleně zvolenými třemi odlišnými oblastmi zájmu, ze kterých byly obrazovou analýzou extrahovány signály kontrakce. Vyzorovaný směr pohybu objektu je vyznačen šipkami. V oblastech ROI1 a ROI2 dochází k opačnému směru pohybu hranice a související změně délky hranice v oblasti. Tento pohyb potvrzují signály získané z těchto dvou oblastí (Obrázek 8.3, vpravo). Jedná se o signály s vysokým stupněm podobnosti (Obrázek 8.4, první shora) a inverzní amplitudou (Obrázek 8.3,

vpravo). Výsledkem extrakce signálu z oblasti zájmu č. 3 (Obrázek 8.3) je signál, který oproti dvěma porovnaným vykazuje zkreslení, neboť se v této oblasti uplatňuje úbytek části hranice na jedné straně z oblasti vystupující a na druhé straně přírůstek hranice do oblasti vstupující. Pohyby dvou částí hranice se tak navzájem částečně kompenzují. Výsledkem je signál s vysokou variabilitou amplitud špiček v jednotlivých kontrakčních cyklech v signálu a také superpozicí také dalších složek v signálu.



Obrázek 8.3 - Signály získané sumou pixelů v oblastech zájmu 1 a 2, normalizované do mezí 0 – 1.

Signály získané ze tří oblastí (ROI1, ROI2, ROI3) byly porovnány (Obrázek 8.4). Graf první shora ukazuje současně signály z oblastí ROI1 a ROI2, kde signál získaný z ROI2 byl invertován. U jednotlivých signálů byly detekovány špičky signálu (lokální maxima dle nastaveného prahu v polovině výšky amplitudy) a hodnocena jejich časová i amplitudová vzdálenost dle postupu uvedeného na Tabulka 8.2. Výpočtem bylo zjištěno, že průměrná odchylka periody mezi špičkami u těchto signálů je 0,02 % pro oblast ROI2 v porovnání s ROI1, amplitudová průměrná odchylka činí 1,2 %. Zatímco třetí oblast ROI3 vykazuje od ROI1 odchylku 3,1 % u průměrné periody, v amplitudě špiček je to 12,4 %.



Obrázek 8.4 – Signály extrahované z oblastí zájmu ROI1 a ROI2 ve vzájemném porovnání (nahore), dole odlišný signál z oblasti ROI3.

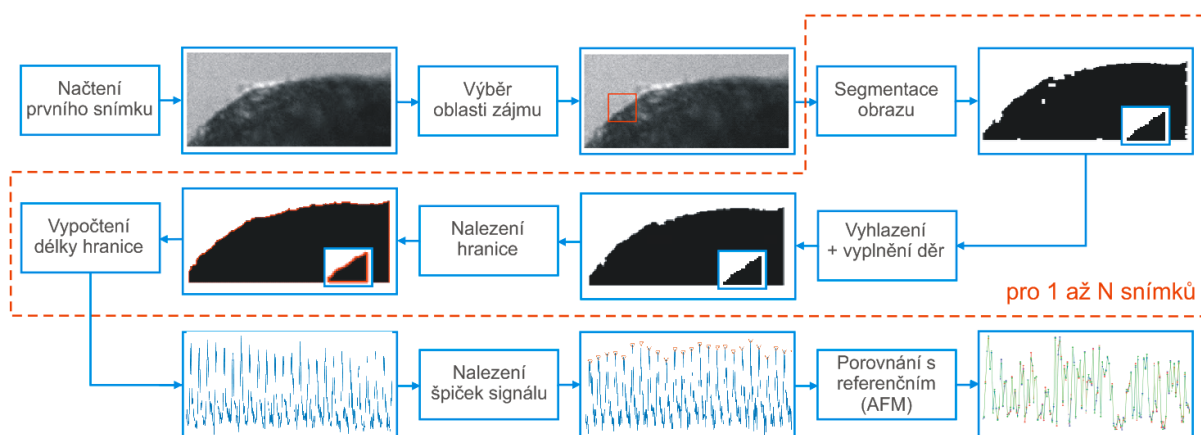
Z výše popsaných důvodů hraje pro získání signálu kontrakce významnou roli výběr vhodného úseku sledovaného objektu pro jeho analýzu. V případě detekce a analýzy délky příliš velkého úseku může dojít ke zvýšení nepřesnosti v detekci velkou odlišností hraniční oblasti EB v některých oblastech. Proto

je do následujících analýz zahrnuta pro srovnání i oblast s větším úsekem s obsahem obrazových nerovností v oblasti hranice spolu s menším úsekem v této oblasti s absencí těchto nerovností.

8.1 Algoritmus pro měření kontrakce a hodnocení signálů

Tato kapitola se zaměřuje na extrakci a hodnocení získaného signálu z videozáznamu s malým úsekem zorného pole s částí objektu EB (výsek oválného EB), který vykazuje změny délky hranice v čase v jednom směru v rámci kontrakce buňky. Eliminuje se tak chyba způsobená výběrem nevhodné oblasti popsáná v předešlém příkladu. Pro analýzu byla použita nasnímaná data společně optickou kamerou Andor Zyla 5.5 a s využitím zařízení AFM JPK NanoWizard. Délka videozáznamu je celkem 101,7 sekund se snímkovací frekvencí 98,3 Hz (celkem 10 000 snímků). Signály AFM byly pořízeny se vzorkovací frekvencí 1000 Hz. Pořízené signály AFM svou délkou záznamu mírně převyšují délku optického záznamu, proto byl záznam AFM zprava oříznut na délku optického signálu. Tato data byla současně podrobena analýze. AFM výškový signál je využit jako signál referenční. Sledované EB vykazuje silné arytmie, které se projevují velkým rozsahem frekvencí tepu a také variabilitou síly tepů. Signál je k časové variabilitě obou parametrů výhodný pro porovnání metod a nabízí komplexnější podmínky pro hodnocení než kontrolní signál s pravidelným ustáleným tepem.

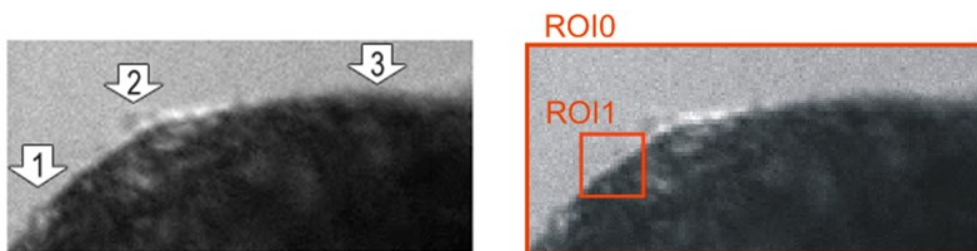
Na obrazová data je aplikován algoritmus vyobrazený formou blokového schématu (Obrázek 8.5). Algoritmus se zaměřuje na detekci hranice EB několika odlišnými způsoby zpracování obrazů a extrakci signálů kontrakce z obrazů, následně hodnocením získaného signálu a porovnáním s referenčním signálem pořízeným AFM. Ve všech případech jsou výsledkem detekčního algoritmu signály kontrakce odpovídající pohybu (smršťování a roztahování) hranice celé oblasti snímku (širšího úseku hranice) nebo části EB ve zvolené oblasti. V další fázi jsou detekovány špičky tohoto signálu, u kterých je provedena časová (frekvenční) a amplitudová analýza signálových špiček v porovnání s detekovanými špičkami v referenčním výškovém AFM signálu. Přehled variant obrazového zpracování, které jsou porovnány, je uveden v Tabulka 8.1.



Obrázek 8.5 – Schéma demonstrující postup při zpracování N snímků pořízeného videozáznamu pro získání hranice v oblasti zájmu. Ve schématu je uvedena ukázka segmentace a nalezení hranice z celých snímků, ROI je vyznačena symbolicky, blíže je specifikována na Obrázek 8.6.

Analýze jsou podrobeny dvě oblasti vyobrazené na Obrázek 8.6. Oblast ROI0 definuje oblast celého snímku, ROI1 definuje vhodně zvolenou oblast zájmu (ROI1), která vykazuje souvislý a rovnoměrný přechod dvou oblastí: buňka a pozadí. Naopak, příklady méně vhodných oblastí pro užší výběr jsou označeny čísly 1 - 3 v levé části Obrázek 8.6. Ty vykazují (1) nesouvislou hranici s malým kontrastem (EB k okolí), kde je navíc uvnitř EB poblíž takto vzniklé úzké hranici oblast s vysokou optickou

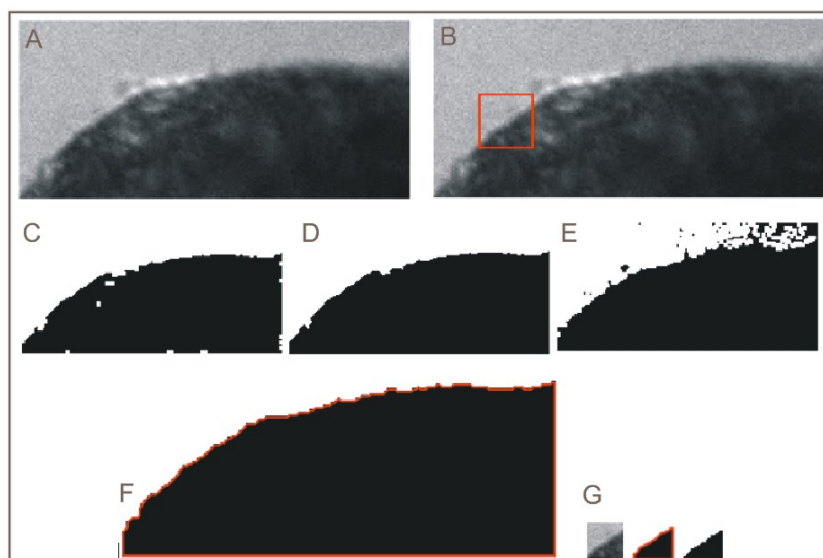
propustností, (2) oblast s vysokou nesouvislou variabilitou intenzity pixelů v hraniční části a kolem hranice objektu a také tvarové výstupky z objektu, (3) rozmazaná oblast – oblast s nejasným a velmi neostrým (postupným) přechodem mezi sledovaným objektem a pozadím. Pro srovnání byly proto současně pro extrakci signálu a jeho analýzu zvoleny: - celá oblast záběru kamerou, odpovídající snímku Obrázek 8.6 vpravo jako ROI0, - mnohem menší oblast vyznačenou červeným ohraničením ROI1 se souvislým přechodem EB do pozadí. V případě výběru takto širokého záběru membrány s vysokou variabilitou charakteru obsažených úseků (ROI0) je snížena možnost optimálního nastavení detekčního algoritmu pro nalezení přechodu „EB – pozadí“ a je tak zvýšena chybovost u detekce hranice. Na druhé straně je ale nutné přihlídnout k okolnosti, že snižováním rozměru ROI se snižuje možné dosažené rozlišení signálu (amplitudy).



Obrázek 8.6 – Vlevo – Snímek s vyznačením tří oblastí s nerovnostmi na hranici EB; Vpravo – Snímek s vyznačenými dvěma oblastmi zájmu

Výběr obdélníkové hranice či hranice jiného tvaru probíhá po načtení a zobrazení prvního snímku. Geometrická oblast ROI definuje masku, která je následně v cyklu aplikována na každý 1 až N snímků celého záznamu – cyklus je v algoritmu vymezen červenou přerušovanou čarou (Obrázek 8.5). V této fázi bylo testováno několik odlišných postupů detekce okraje v ROI0 a ROI1:

- A) V prvním kroku této varianty je provedena segmentace na základě prostého prahování s vhodně (ručně) nastaveným prahem. Výstupem je binární obraz. S využitím morfologických operací eroze a dilatace je binární snímek upraven do vhodné formy pro přesné vymezení hranice. Úpravy sestávající z vyplnění případných děr v objektu (aplikována je nyní morfologická dilatace) a vyhlazení případných nerovností hranice (aplikována je v tomto případě morfologická eroze). Poté je hranice objektu přesně vymezena, zahrnuje také hraniční body snímku. Tyto hraniční body je možné z celkové hranice odstranit, takto složka je však odstraněna normalizací získaného signálu. Alternativně je možné nahradit krok nalezení hranice výpočtem sumy pixelů v invertovaném binárním snímku, neboť krok vede k výpočtu plochy sledovaného objektu a sledování její změny, na rozdíl od délky hranice. Ukázka zpracovaných snímků je vyobrazena na Obrázek 8.7. Výřez zorného pole (A) je podstoupen segmentaci a úpravám získaného binárního obrazu (D), (F) ukazuje nalezenou hranici. Obdobný postup (G) pro vymezenou oblast zájmu červeným ohraničením (viz B) zahrnuje tuto ROI, zpracovaný binární obraz a nalezenou hranici (G, v původní velikosti, bez zvětšení obrázku). Snímky (C) a (E) na Obrázek 8.7 zobrazují binární snímky vzniklé chybným nastavením parametrů. V prvním případě jsou v (negativním) binárním objektu přítomny úseky s chybějícími shluky pixelů (zářezy) a u druhého naopak je přítomna řada nežádoucích částic a objektů, mimo hlavní objekt, na kterém je hledána hranice.



Obrázek 8.7 – A – vstupní snímek, B – vyznačená oblast zájmu, D – binární oblast po segmentaci obrazu se správným nastavením parametrů, C a E s nepřesným nastavením vstupních parametrů, F – výsledný snímek po úpravě morfologickými funkcemi s vyznačenou hranicí objektu (inverzního objektu), G – obdobný postup pro vyznačenou oblast zájmu v původní velikosti.

- B) V tomto případě je segmentace obrazu, na rozdíl od bodu A), provedena na základě hranové detekce. Hranovou detekcí je získána oblast pixelů skokové změny jasu odpovídající ohraničení sledovaného objektu a převedena do binární oblasti. Po zpracování binárního snímku s využitím morfologické dilatace je místy nespojitá hrana propojena a zvýšena její tloušťka na definovanou hodnotu. Poté je nalezeno ohraničení, opět zahrnující ohraničení snímku na jedné straně oddělené hranicí. Opět je alternativně možné využít výpočet sumy pixelů ve snímku a tím nahradit nalezení hranice. Výsledek pro ROI je uveden na Obrázek 8.8.



Obrázek 8.8 – Hranice získaná hranovou detekcí (vlevo), hranice po úpravě dilatací a detekovaná hranice v oblasti zájmu pro výpočet délky hranice (červeně).

- C) Třetí postup bez jakéhokoli obrazového zpracování z celé oblasti snímku anebo z vybrané oblasti zájmu vypočte již v šedotónovém snímku sumu hodnot pixelů. Získáním sumy hodnot pixelů z každého snímku je tak sestaven výsledný signál kontrakce.
- D) Metoda aktivních kontur („snakes“) – Metoda aktivních kontur je populární metodou využívanou v mnoha oblastech. Tato metoda umožňuje analýzu již šedotónového snímku a nalezení hranice hledaného objektu postupným stahováním křivky směrem k hranici objektu. Výsledná kontura je nalezena dle [67].

Souhrn uvedených postupů je uveden v tabulce Tabulka 8.1.

Tabulka 8.1 – Přehled testovaných postupů v detekci hranice objektu

Název	Postup	Výsledné snímky	Zdroj signálu	Název signálu
THR	S využitím segmentace na základě prostého prahování (dle schématu na Obrázek 8.5)	Obrázek 8.7	Délka hranice	OPT-THR
EDG	S využitím segmentace na základě detekce hran (dle schématu na Obrázek 8.5 s obměnou)	Obrázek 8.8	Délka hranice	OPT-EDG
PIX	S využitím výpočtu sumy pixelů v šedotónovém obrazu	-	Suma pixelů	OPT-PIX
SNK	S využitím metody adaptivních kontur (snakes) šedotónovém obrazu	-	Délka hranice	OPT-SNK

Signály extrahované jednotlivými postupy mají diametrálně odlišnou amplitudu, ať už se liší řádově anebo jednotkou. Příkladem může být výškový signál AFM získaný v mikrometrech anebo suma pixelů oblasti objektu bez pozadí u postupu PIX s o několik řádů vyšší hodnotou než je délka hranice u metod EDG anebo SNK. Proto jsou signály podrobeny normalizaci do hodnot od 0 do 1, aby bylo možné provést srovnání jejich amplitudy. Normalizace na spodní hranici (0) je vykonána odečtením minimální hodnoty signálu od celého vektoru hodnot, k normalizaci na horní hranici (1) dochází vydělením celého vektoru hodnot signálu nalezeným maximem signálu. Signál získaný optickou metodou je v této formě ještě nedostatečně upraven pro srovnání s referenčním signálem AFM. Proto je u obou signálů nejdříve spočtena jejich průměrná hodnota a následně u signálu získaného optickou metodou (THR, PIX, EDG nebo SNK) je před dalším hodnocením proveden posun jeho úrovně o vypočtený rozdíl průměrných hodnot. Průměrná hodnota signálu AFM je vždy větší než u signálu získaných optickou metodou, neboť je tato metoda přesnější a hodnoty amplitudy nevykazují takový rozptyl jako u signálů získaných optickou metodou.

Postup v hodnocení pro porovnání s referenčním AFM sestává z detekce špiček cyklického signálu kontrakce jednotlivými postupy (Tabulka 5.1). U detekovaných špiček signálů je výpočtem získán vektor **TP2P** jako vektor časových rozdílů vzdáleností dvojic po sobě následujících špiček (period mezi špičkami), z vektoru jsou výpočtem **FP2P = 1/TP2P** získány jednotlivé frekvence a z průměrné hodnoty **TP2P_{prum}** je výpočtem **FP2P_{prum} = 1/TP2P_{prum}** získána průměrná frekvence špiček. Tyto vektory a průměrné hodnoty jsou použity pro další výpočet. Hodnocené parametry uvádí

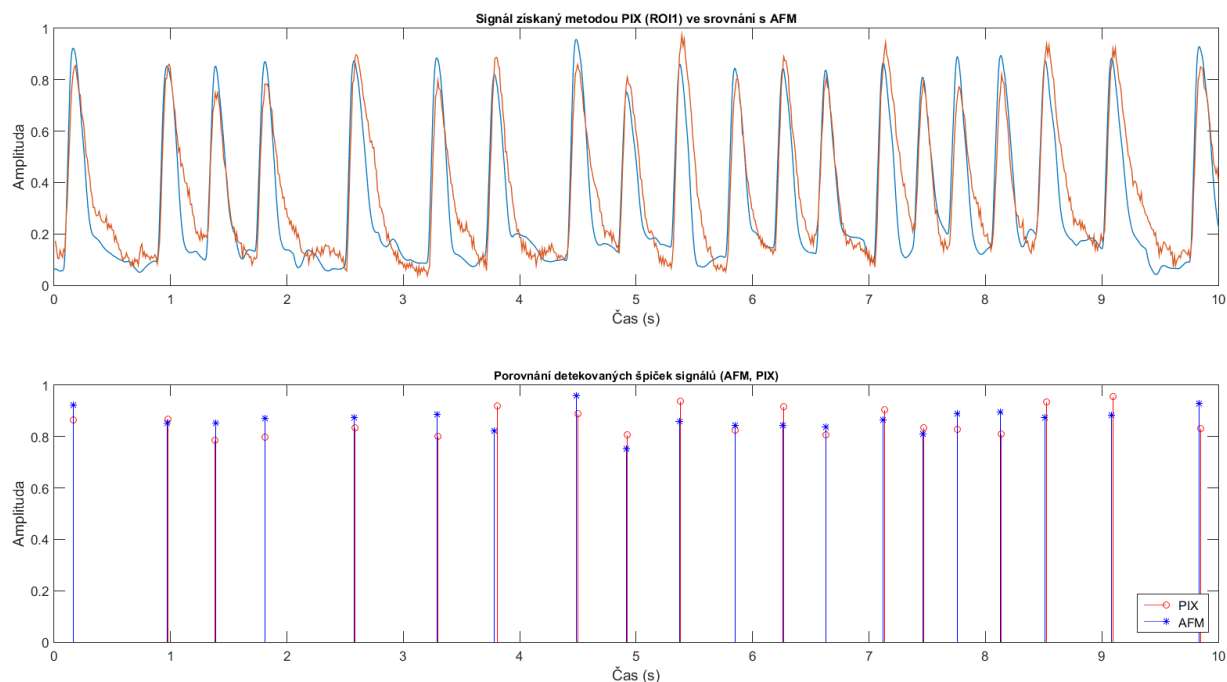
Tabulka 8.2 – Přehled hodnocených parametrů

Název hodnoceného par.	Způsob výpočtu parametru
Průměrná hodnota [Hz]	Aritmetický průměr z vektoru FP2P
Průměrná odchylka [%]	Rozdíl mezi aritmetickým průměrem hodnot FP2P a aritmetickým průměrem referenčních hodnot AFM vztažených k AFM vyjádřený v procentech
Odchylka (medián) [%]	Rozdíl mezi mediánem hodnot FP2P a mediánem referenčních hodnot AFM vztažených k AFM vyjádřený v procentech
Průměrná odchylka (jednotlivých hodn.) [%]	Průměrný rozdíl počítaný pro jednotlivé hodnoty vztažený k jednotlivým hodnotám AFM; vyjádřený v procentech
Maximální rozdíl hodnot [%]	Maximální hodnota z průměrné procentuální odchylky (viz předešlý par.)
Min. rozdíl hodnot [%]	Minimální hodnota z průměrné procentuální odchylky

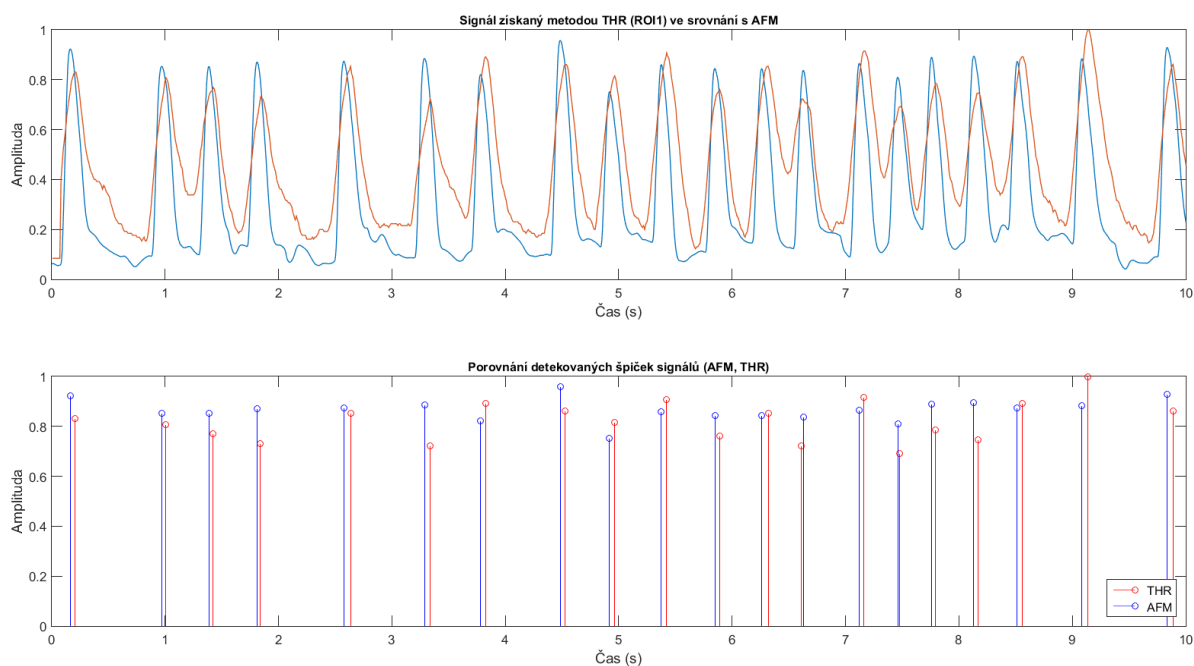
Prezentace výsledků pro porovnání přesnosti hodnocení metodou AFM a optickou metodou s různými postupy je provedena číselně a graficky. Číselně jsou vyjádřeny procentuální odchylky vztažené k AFM hodnotám, graficky pak výsledky, které výhodně vizualizují změny. Např. periody *TP2P* jsou vyneseny graficky na Obrázek 8.12 formou histogramů. Z grafů je patrná velmi malá odchylka v časové vzdálenosti dvojic špiček ve srovnání s AFM. Amplitudy byly pro názornost vyneseny formou krabicových grafů (Obrázek 8.13).

8.2 Výsledky

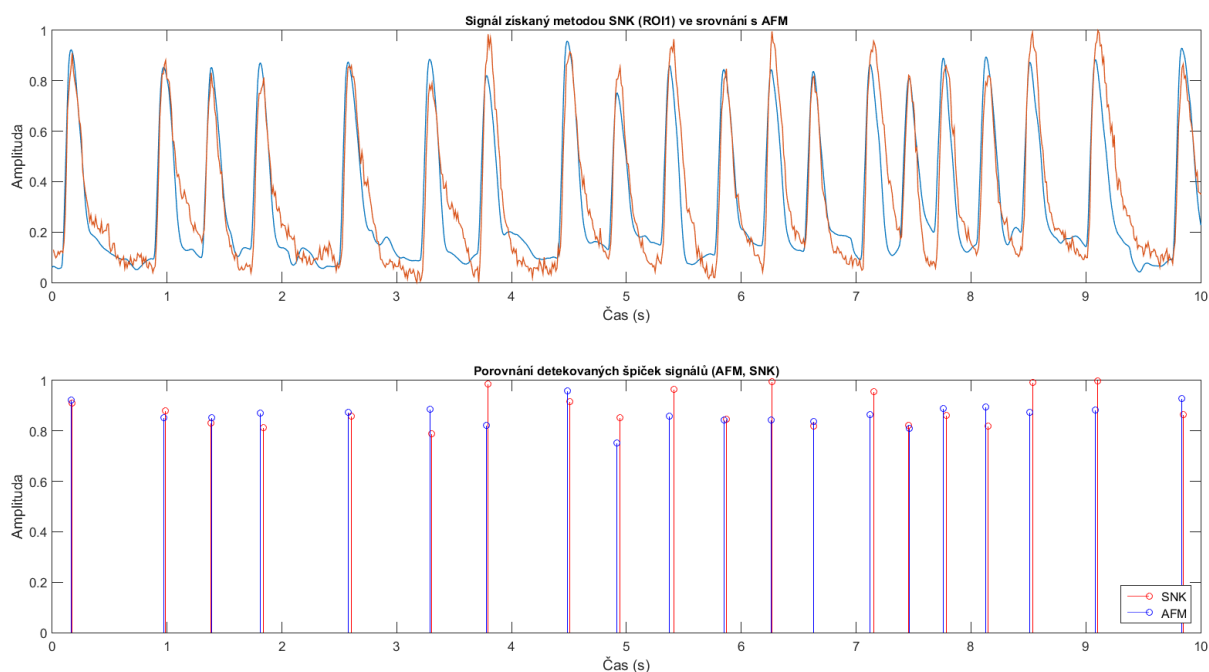
Analýzy byly provedeny dvěma směry. V prvním případě bylo cílem porovnat postupy uvedené v Tabulce 8.1 s referenčním signálem AFM. V druhém případě se zaměřovaly na hodnocení odlišnosti v úrovni a přesnosti detekcí v odlišných oblastech zájmu. Na následujících čtyřech obrázcích (Obrázek 8.9 až Obrázek 8.11) je zobrazen 10s úsek obsahující extrahované signály v horní části a špičky detekované v cyklech signálu v dolní části grafů pro jednotlivé postupy PIX, THR, EDG a SNK. Signály jsou pro názornost zobrazeny v překryvu s AFM výškovým signálem (referenční, modře), patrná je zejména tvarová odlišnost signálů. Detekované špičky v dolní části jsou vyjádřeny názorným stopkovým grafem, ze kterého je možné rozeznat amplitudový rozdíl u jednotlivých špiček a i jemný časový posun mezi detekovanými body, který má vliv na velikost jednotlivých period cyklů.



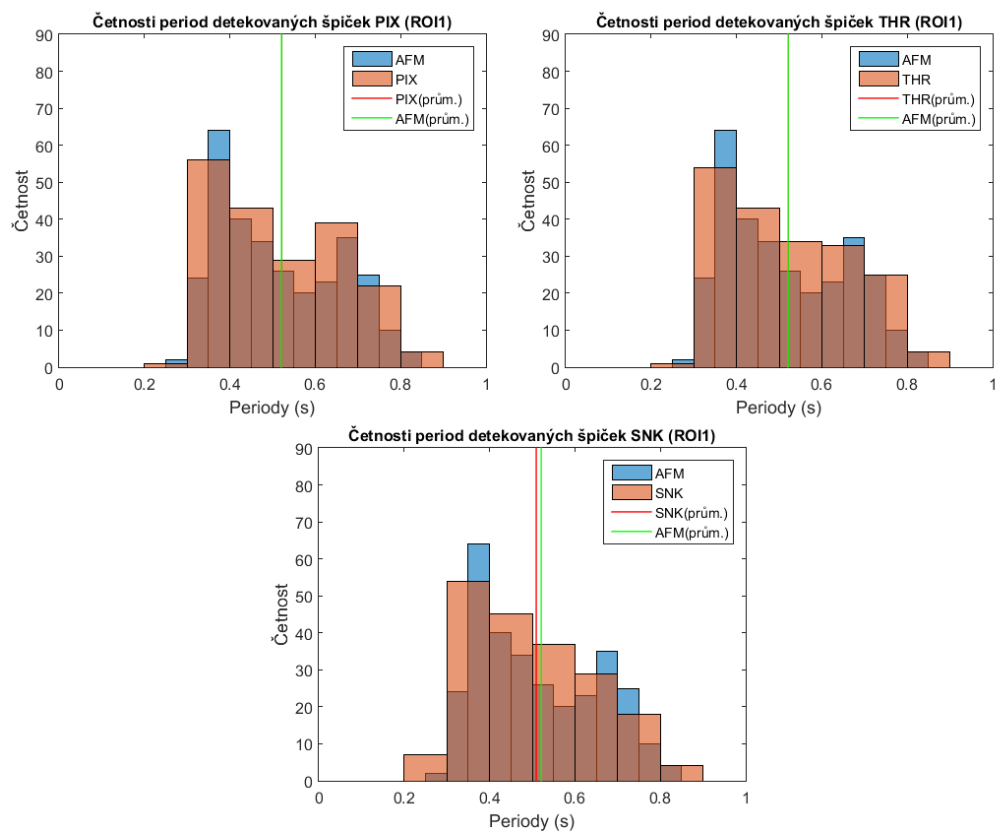
Obrázek 8.9 – Ukázka 10s úseku signálu získaného metodou PIX v oblasti ROI1 (červeně) ve srovnání s referenčním AFM výškovým signálem (modře). Dole jsou detekované špičky obou signálů vyjádřené stopkovým grafem, ze kterého jsou patrné amplitudové a časové odlišnosti v jednotlivých cyklech.



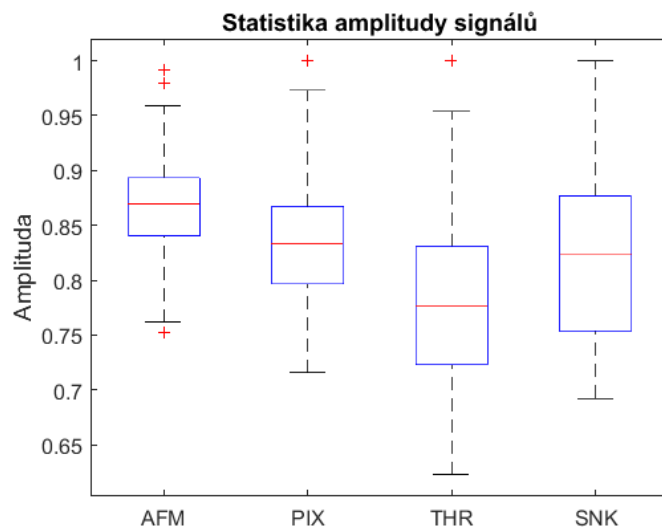
Obrázek 8.10 – Ukázka 10s úseku signálu získaného metodou THR v oblasti ROI1 (červeně) ve srovnání s referenčním AFM výškovým signálem (modře). Dole jsou detekované špičky obou signálů vyjádřené stopkovým grafem, ze kterého jsou patrné amplitudové a časové odlišnosti v jednotlivých cyklech.



Obrázek 8.11 – Ukázka 10s úseku signálu získaného metodou SNK v oblasti ROI1 (červeně) ve srovnání s referenčním AFM výškovým signálem (modře). Dole jsou detekované špičky obou signálů vyjádřené stopkovým grafem, ze kterého jsou patrné amplitudové a časové odlišnosti v jednotlivých cyklech.



Obrázek 8.12 – Porovnání nalezených period TP2P pro signály PIX, THR a SNK v porovnání s referenčním AFM formou histogramů.



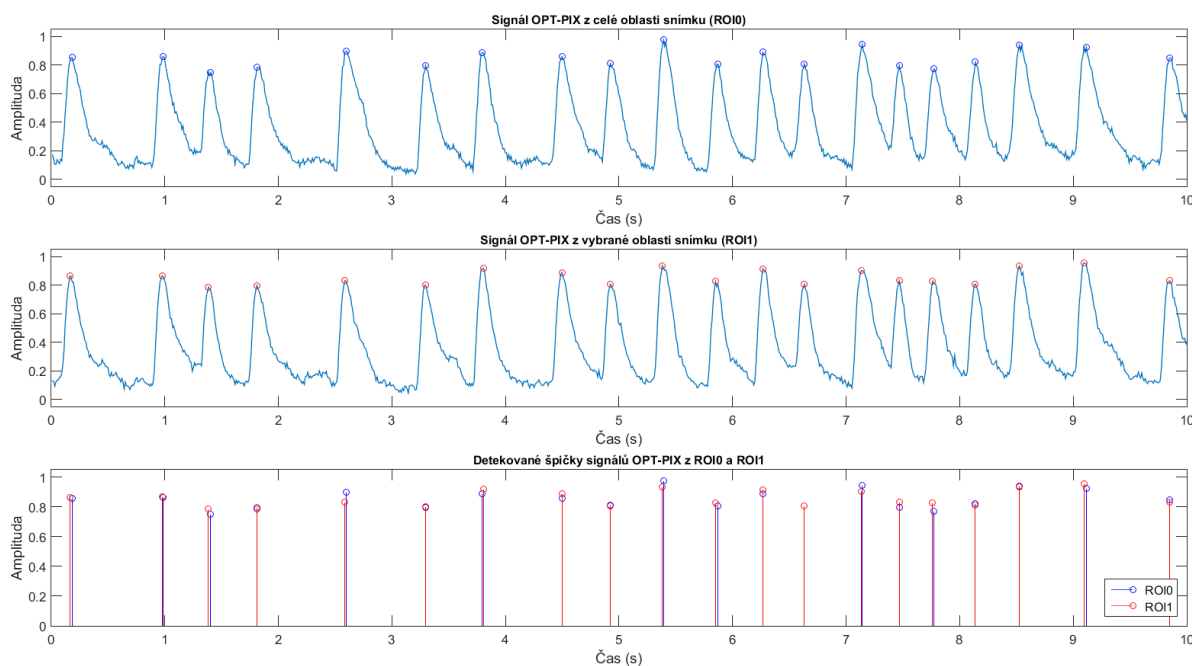
Obrázek 8.13 - Porovnání detekovaných AP2P pro signály PIX, THR a SNK v porovnání s referenčním AFM formou krabicových grafů.

Tabulka 8.3 – Statistické hodnocení detekovaných špiček signálu kontrakce pomocí AFM a jednotlivých postupů pro optickou metodu v ROI1, ve srovnání s referenčním AFM.

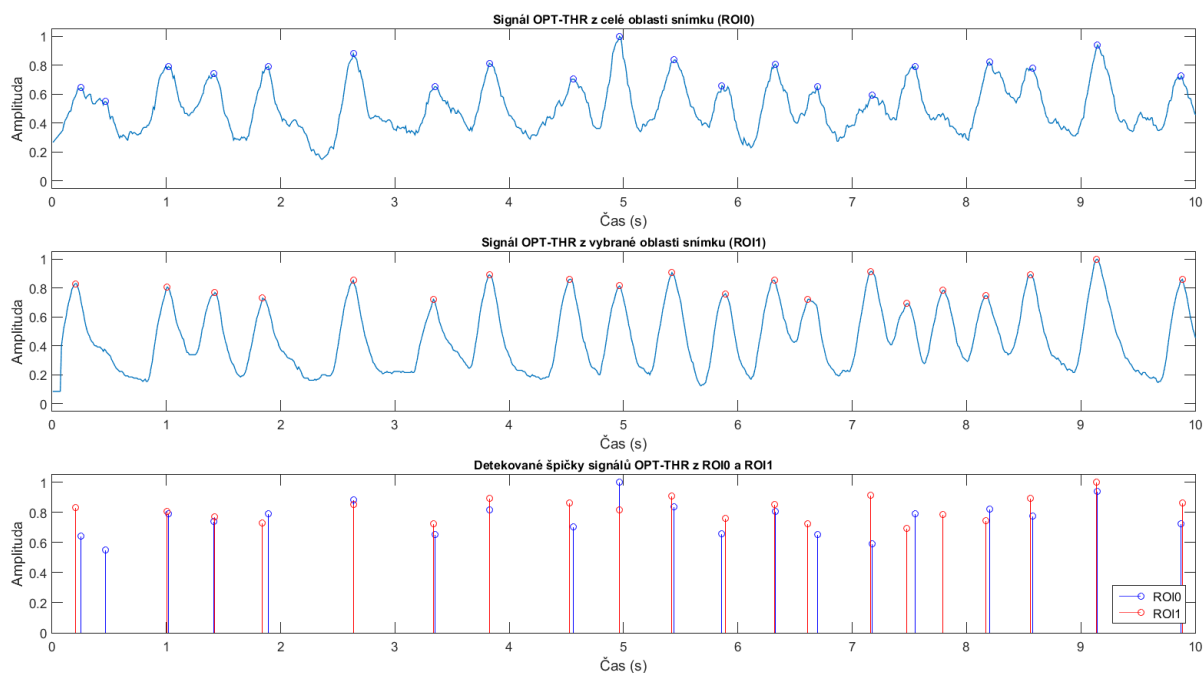
Signál	Frekvence					
	Průměrná hodn. [Hz]	Průměrná odchylka [%]	Odchylka [%] (medián)	Prům. odchylka [%] (jednotlivých hodn.)	Max. rozdíl hodnot [%]	Min. rozdíl hodnot [%]
AFM	1,9199	-	-	-	-	-
OPT_PIX	1,9183	0,08	0,58	2,01	8,68	$7,56 \cdot 10^{-4}$
OPT_THR	1,9187	0,06	3,57	2,95	24,40	$7,56 \cdot 10^{-4}$
OPT_EDG	-	-	-	-	-	-
OPT_SNK	1,9639	2,29	0,17	2,87	11,08	0,21
Signál	Amplituda					
	Průměrná hodn. [-]	Průměrná odchylka [%]	Odchylka [%] (medián)	Prům. odchylka [%] (jednotlivých hodn.)	Max. rozdíl hodnot [%]	Min. rozdíl hodnot [%]
AFM	0,8339	0	-	-	-	-
OPT_PIX	0,8339	0	0,26	6,44	23,34	0,0039
OPT_THR	0,8339	0	0,01	8,77	29,85	0,1702
OPT_EDG	-	-	-	-	-	-
OPT_SNK	0,8339	0	2,80	7,83	17,29	0,8287

8.2.1 Srovnání vlivu výběru oblasti

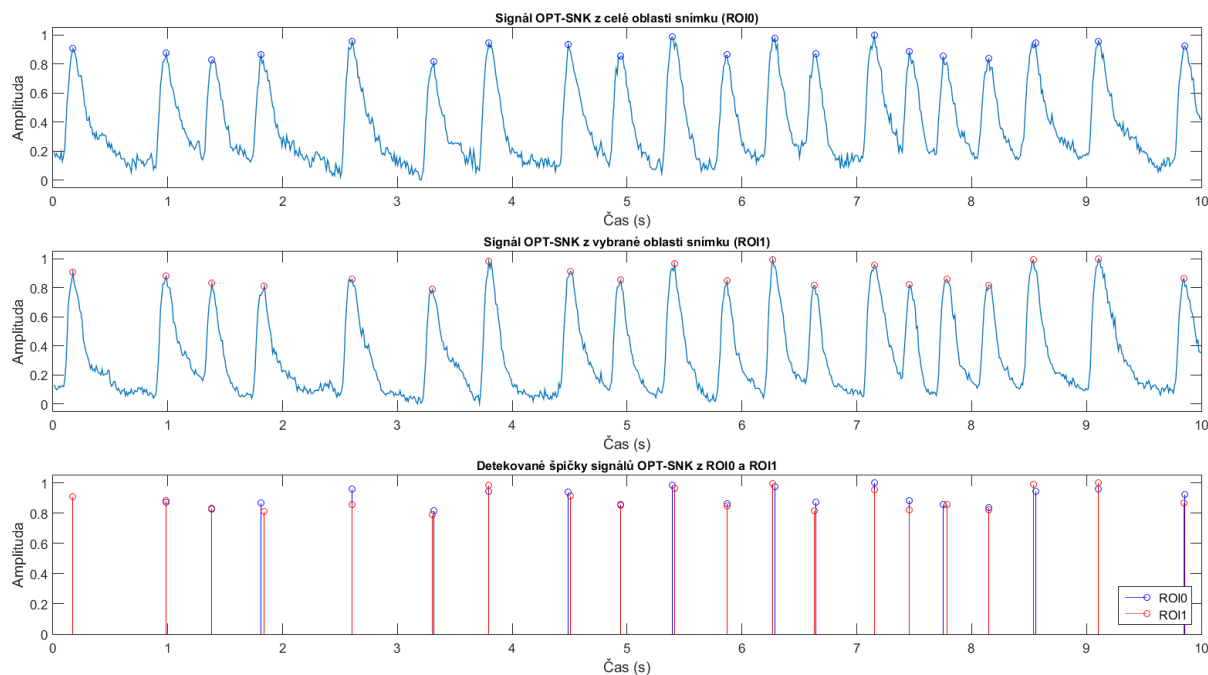
V předešlé části byly srovnány jednotlivé postupy (PIX, THR, EDG, SNK). Na jednotlivé metody může mít vliv výběr (pozice a velikost) oblasti zájmu a související charakter hranice v této oblasti. Další analýza tak poukazuje na rozlišený výsledků dle rozdílných oblastí ROI1 a ROI0 (viz Obrázek 8.6).



Obrázek 8.14 - Ukázka 10s úseku signálu získaného metodou PIX v oblastech ROI0 celého snímku ve srovnání se signálem z užšího výběru. Dole jsou detekované špičky obou signálů vyjádřené stopkovým grafem, ze kterého jsou patrné amplitudové a časové odlišnosti v jednotlivých cyklech.



Obrázek 8.15 - Ukázka 10s úseku signálu získaného metodou THR v oblastech ROI0 celého snímku ve srovnání se signálem z užšího výběru. Dole jsou detekované špičky obou signálů vyjádřené stopkovým grafem, ze kterého jsou patrné amplitudové a časové odlišnosti v jednotlivých cyklech. Z ukázky je patrná chybná detekce (falešných špiček) u oblasti ROI0.



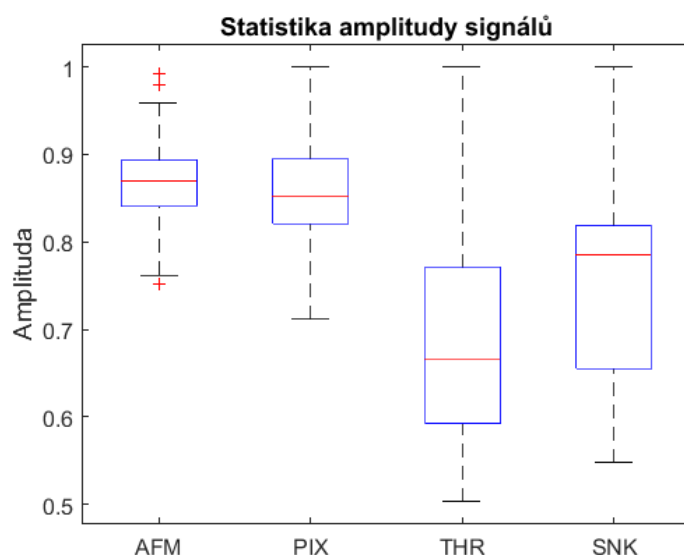
Obrázek 8.16 - Ukázka 10s úseku signálu získaného metodou PIX v oblastech ROI0 celého snímku ve srovnání se signálem z užšího výběru. Dole jsou detekované špičky obou signálů vyjádřené stopkovým grafem, ze kterého jsou patrné amplitudové a časové odlišnosti v jednotlivých cyklech.

Obdobně jako Tabulka 8.3, tak i následující Tabulka 8.4 udává přehled procentuální odchylky od referenčního signálu AFM, tentokrát pro signály získané z ROI0.

Tabulka 8.4 – Statistické hodnocení detekovaných špiček signálu kontrakce pomocí AFM a jednotlivých postupů pro optickou metodu, ve srovnání s referenčním AFM. Jedná se o data zpracovaná v ROIO – v oblasti celého snímku.

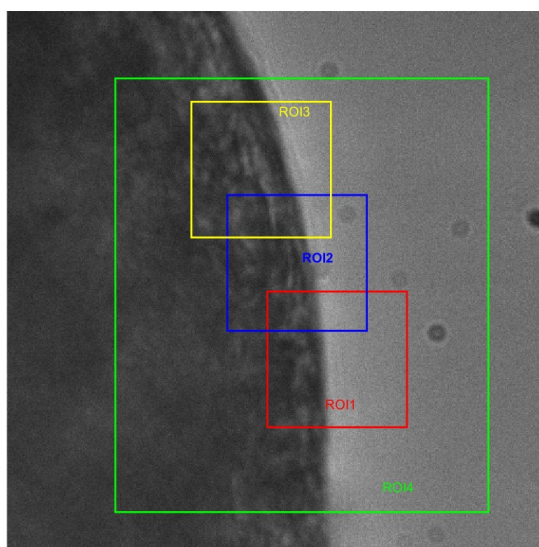
Signál	Frekvence FP2P					
	Průměrná hodn. [Hz]	Průměrná odchylka [%]	Odchylka [%] (medián)	Prům. odchylka [%] (jednotlivých hodn.)	Max. rozdíl hodnot [%]	Min. rozdíl hodnot [%]
AFM	1,9199	-	-	-	-	-
OPT_PIX	1,9189	0,05	0,58	2,22	8,85	0,0111
OPT_THR	1,8105	5,70	1,60	31,32	78,22	0,1541
OPT_EDG	-	-	-	-	-	-
OPT_SNK	1,9619	2,19	0,17	3,08	11,08	0,1559
Signál	Amplituda PA					
	Průměrná hodn. [-]	Průměrná odchylka [%]	Odchylka [%] (medián)	Prům. odchylka [%] (jednotlivých hodn.)	Max. rozdíl hodnot [%]	Min. rozdíl hodnot [%]
AFM	0,8339	0	-	-	-	-
OPT_PIX	0,8339	0	0,55	6,67	21,82	0,0340
OPT_THR	0,8339	0	2,32	13,91	48,17	0,0075
OPT_EDG	-	-	-	-	-	-
OPT_SNK	0,8339	0	3,61	7,82	17,29	0,8287

Změny jsou patrné i u amplitud signálových špiček, jejichž charakteristika je vyjádřena v krabicových grafech na Obrázek 8.17

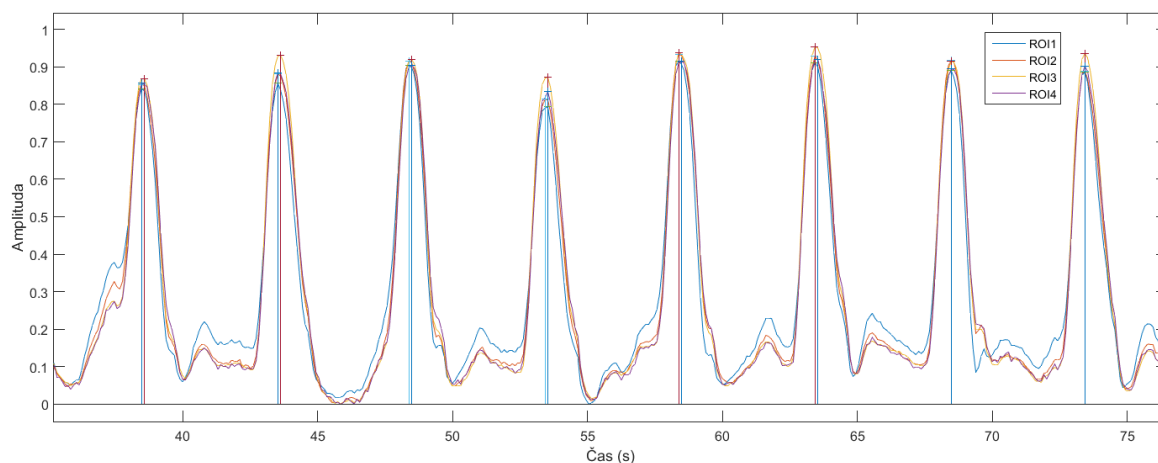


Obrázek 8.17 – Krabicové grafy vyjadřující statistiku amplitudy signálových špiček v ROIO.

Následující příklad demonstruje, že pokud je hranice sledovaného úseku souvislá, viz Obrázek 8.18, kde se jedná o rozsáhlý úsek hranice dalšího EB na snímku s rozlišením 1700 x 1700 px, časové i amplitudové změny detekovaných špiček jsou minimální. V tomto případě byla použita pro výpočet metoda THR (viz Tabulka 8.1). Pro analýzu byly úmyslně zvoleny oblasti tak, aby vykazovaly návaznost v postupu podél membrány (ROI1 - ROI3) a ROI4 zahrnovala všechny oblasti. Výsledné extrahované signály bez jakékoli úpravy jsou zobrazeny na Obrázek 8.19.



Obrázek 8.18 – Snímek hranice EB v rozlišení 1700 x 1700 px (zvětšení objektivem 40X) s vyznačenými čtyřmi odlišnými oblastmi.

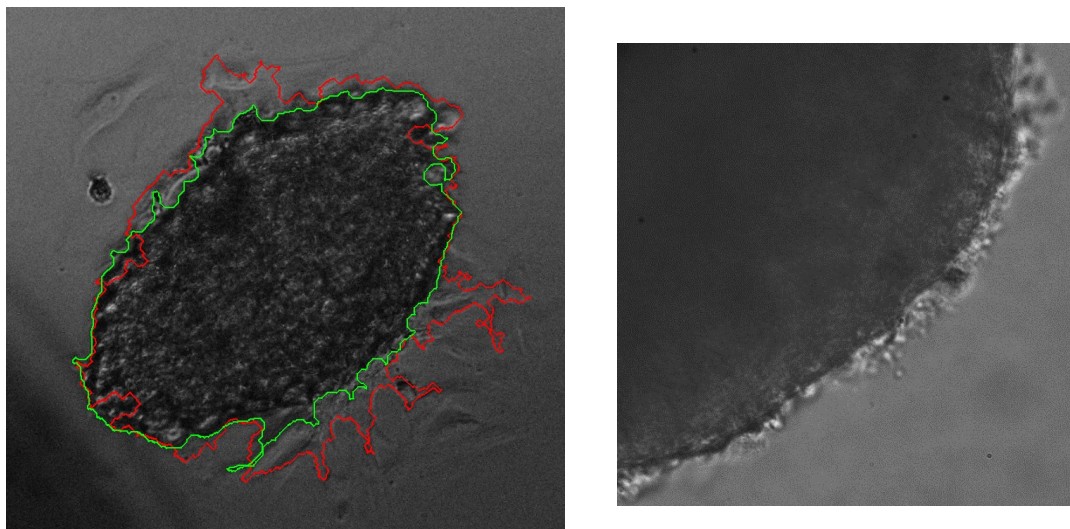


Obrázek 8.19 – Signály získané metodou PIX (viz Tabulka 8.1) pro 4 odlišné ROI. Signály vykazují vysokou tvarovou shodu a minimální odchylku v detekovaných špičkách.

Optická metoda v případě vhodné morfologie EB vykazuje v některých případech poměrně úspěšnost. V případě velmi problematické morfologie a struktury pozorované ve světlém poli, kde velmi názorným příkladem může být snímek C z Obrázek 8.1, je detekce hranice sledovaného objektu velmi problematická. EB je v tomto případě adherováno k povrchu misky a hojně rozrostlé do stran. Segmentací obrazu s využitím prostého prahování a segmentací obrazu a následnými úpravami obrazu s využitím morfologických operací popsaných ve schématu Obrázek 8.5, navíc obsahující kroky dodatečné eliminace malých objektů, bylo dosaženo detekce uvedené na

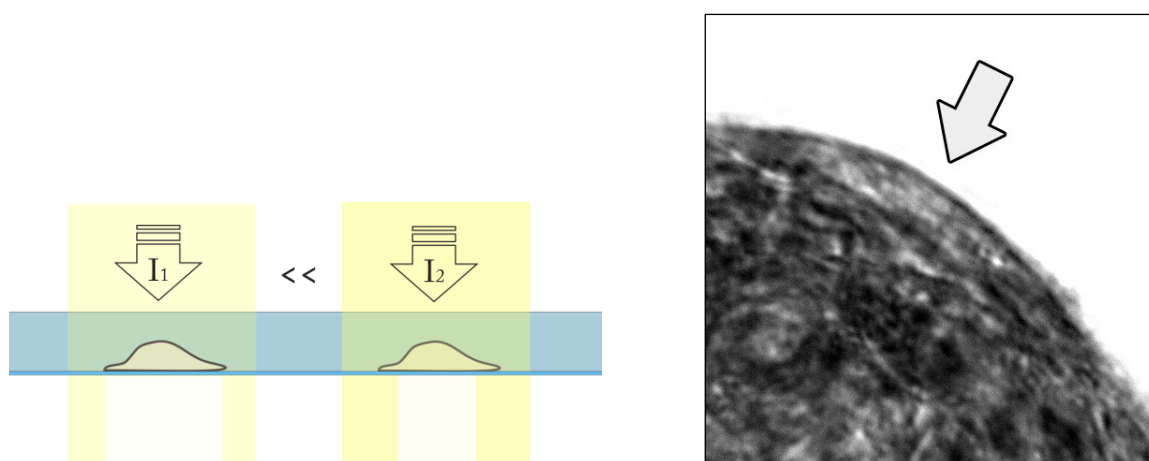
Obrázek 8.20 vlevo. V případě získané kontury formou červené čáry byla v postupu provedena segmentace na základě hranové detekce s operátorem Sobel. Výsledky se výrazně neliší ani v případě použití dalších operátorů (Prewitt, Canny) či úpravou nastavených parametrů detekce. V druhém případě (zelenou čarou) je vyznačena kontura získaná segmentací na základě prostého prahování. Hranice objektu jsou často jednak stěží definovatelné a uvedenými detekčními metodami zachytitelné.

Obdobný případ nastává i u volných EB (více odpovídajícím kulovitému tvaru), které ve velkém množství případů obsahují vystouplé shluky kardiomyocytů (Obrázek 8.20 vpravo).



Obrázek 8.20 – EB se dvěma získanými konturami odlišnými postupy segmentace (vlevo), ukázka hranice dalšího EB (vpravo).

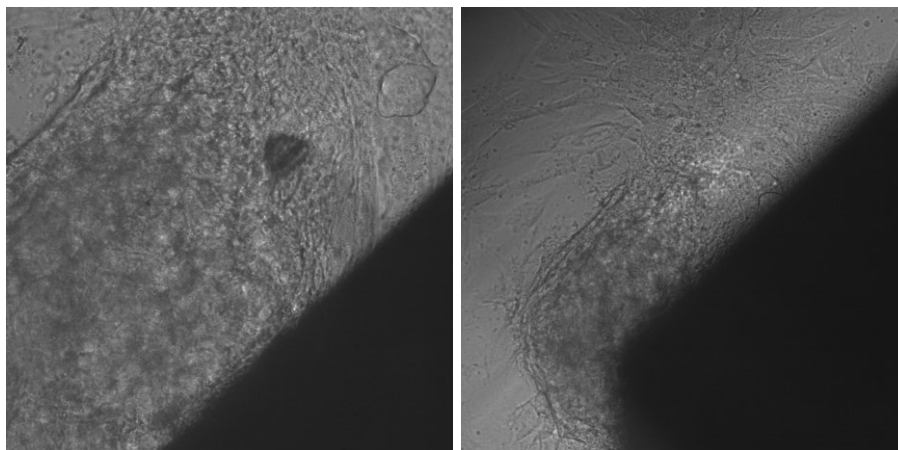
Pro zlepšení možností detekce hranice je navržen následující postup. Ten využívá možnosti úpravy ostření na různou rovinu sledovaného objektu s kombinací zvyšování úrovně jasu průchozího světla. Efekt, který nastává zvýšením intenzity jasu průchozího světla, je znázorněn na Obrázek 8.21. V případě běžné intenzity jasu průchozího světla (I_1), která je používána pro pozorování objektu, jsou na snímáči promítnuty i okraje EB s nerovnostmi. Vhodným zvýšením jasu průchozího světla (na I_2) a současným přeostrněním na oblast nad rovinu nejnižší vrstvy EB (povrch misky) lze dosáhnout prosvícení okrajů EB a získání snímků sledovaného EB s výraznou hranicí. I_2 je většinou mnohonásobně vyšší než I_1 . Tato hranice je však blíže středu EB a ostatní body směrem k okraji snímku jsou na snímáči přesaturovány. Výsledek u vybraného snímku je zobrazen na Obrázek 8.21 (vpravo). Šipka ukazuje na vniklou souvislou hranici.



Obrázek 8.21 – Princip eliminace opticky tenkých úseků na okraji EB metodou zvýšené intenzity jasu průchozího světla (vlevo). Vzniklý obraz z relativně jasnou souvislou hranicí, na kterou poukazuje šipka ve snímku. Okolní pixely jsou přesaturované.

V mnohem náročnějších případech s adherovaným a intenzivně rozrostlým shlukem kardiomyocytů (příklad je uveden na Obrázek 8.22) metoda založená na detekci hrany ztrácí uplatnění a je přímo

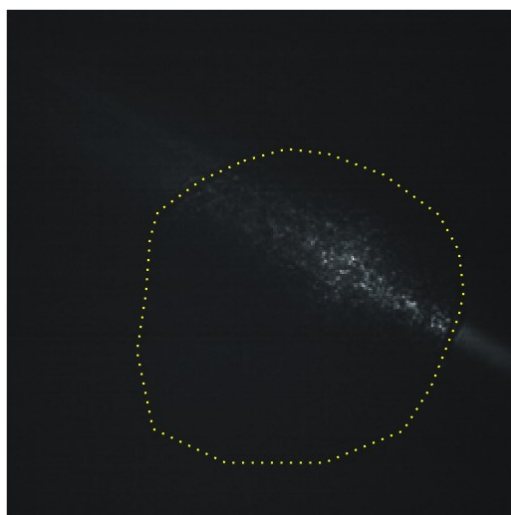
závislá na přítomnosti úseků s dostatečně výraznou hranicí objektů. V tomto případě nachází dobré předpoklady další testovaná metoda, uvedená v další kapitole.



Obrázek 8.22 – Ukázka značně rozrostlých kultivovaných iPSC-CM, kde metoda detekce hranice objektu většinou ztrácí na účinnosti.

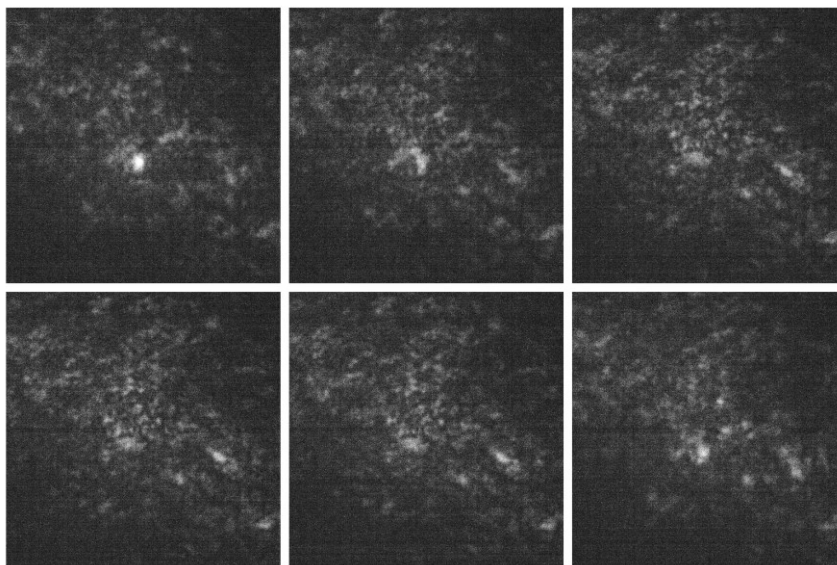
8.3 Difrakční metoda

Při využití mikroskopie atomárních sil se rozptyluje paprsek infračerveného laseru na držáku hrotu přitisknutého ke vzorku. Světlo laseru dále prochází optickou cestou. Jak už bylo uvedeno v kapitole 7.1, z tohoto důvodu byl do optické cesty v měřicím zařízení integrován filtr FES650 typu dolní propust s mezní vlnovou délkou 650 nm pro jeho utlumení. Přesto je, vzhledem k vysoké intenzitě použitého laserového záření, v obraze znatelný artefakt (viz např. Obrázek 8.23). Snímek zobrazuje EB oválného tvaru, na nějž je v oblasti s vysokou koncentrací jasných bodů v obraze umístěn hrot uchycený na hlavici AFM. Laser vytváří směrový efekt, který z části prosvěcuje shluky kardiomyocytů. Vzhledem ke špatné rozeznatelnosti hranice EB byla tato hranice ručně vyznačena žlutou přerušovanou čarou. Snímek je vysoce kontrastní, protože není při pozorování využito průchozího světla a velká část EB a jeho okolí mimo zmíněný artefakt tvoří tmavé pozadí.



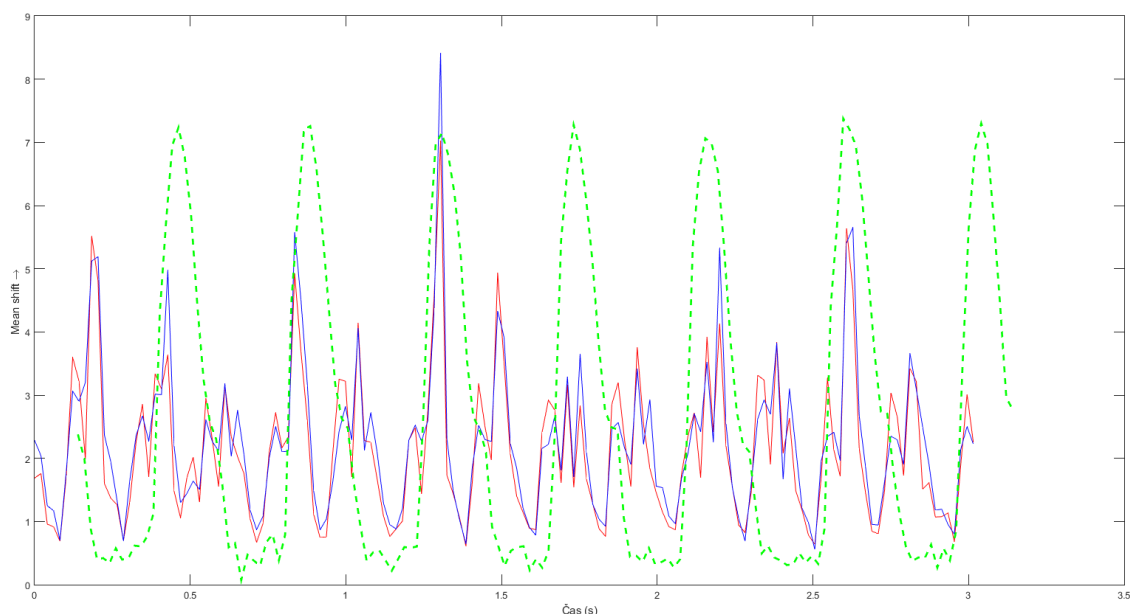
Obrázek 8.23 – Snímek pořízený na mikroskopu s kamerou Zyla 5.5 bez průchozího světla se zapnutým laserem (IR) rozptýleným na držáku hrotu AFM. Snímek je v rozlišení 1700 x 1700 px. Bylo použito optické zvětšení 20X.

Zaměřením na užší oblast, a to použitím objektivu s vyšším zvětšením, lze pozorovat shluky pixelů, které odpovídají pronikajícímu laserovému záření ke snímači. Tyto shluky jsou mnohem výraznější a relativně dobře rozeznatelné, nasvětlená oblast je mnohem větší, pokud je použit laser s přímou průchodností objektem, tj. bez rozptylu na držáku (ten musí být v tuto dobu vychýlen). Detail této oblasti v případě odstavení držáku s hrotem stranou je vidět na Obrázek 8.24. Obrázek obsahuje sadu šesti vybraných, po sobě s různou pauzou následujících, snímků, které charakterizují změny, které v oblasti nastávají při kontrakci a následné relaxaci shluku kardiomyocytů. Konkrétně se jedná o zlomek snímků ze sekvence jednoho cyklu kontrakce. Dále uvedené postupy se snaží o bližší analýzu ještě užších oblastí z těchto snímků a extrakci signálu kontrakce ze změn, které v obraze nastávají. Cílem je získané signály porovnat s referenčním signálem AFM.

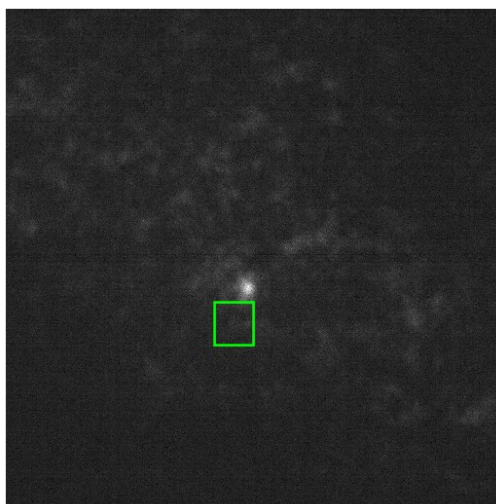


Obrázek 8.24 – Sada šesti vybraných snímků z videosekvence demonstrující změny, které v oblasti nastávají.

V prvním případě byla testována metoda trasování bodů KLT (Kanade–Lucas–Tomasi (KLT) feature tracker) [142]. Vývoj této metody za účelem hodnocení pohybu pixelů či shluků pixelů je však v prvopočátku. Ukázka jednoho z výstupů je na Obrázek 8.25. Signály získané metodou KLT a extrakcí výpočtem sumy pixelů z vybrané oblasti jsou společně zobrazeny v jednom grafu.



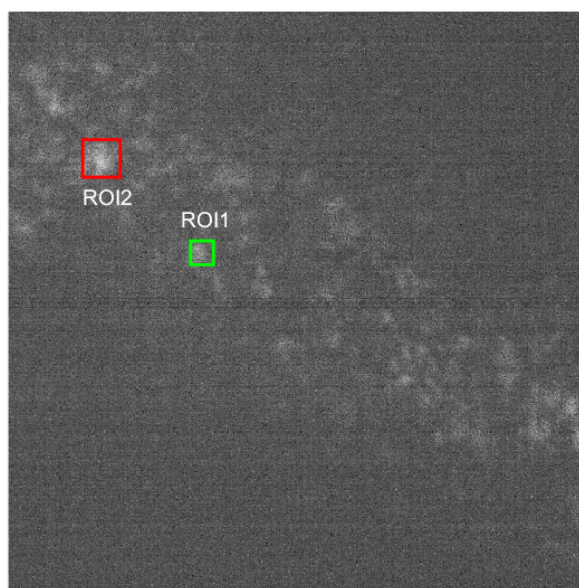
Obrázek 8.25 – Ukázka signálů získaných KLT (červená a modrá křivka) a zelenou přerušovanou křivkou je zobrazen signál získaný sumou pixelů z oblasti vyznačené na



Obrázek 8.26 – Snímek s vyznačenou oblastí zájmu, ze které probíhala extrakce signálu.

Z výsledků je patrný posun signálu a nejsou přítomny jednoznačné špičky, tak jak je tomu v druhém případě. Metoda KLT zatím není příliš úspěšná.

V dalším případě byla použita metoda výběru vhodné oblasti a extrakce signálu z této oblasti jako sumy hodnot pixelů v čase. Pro analýzu je využit 94 sekundový záznam s celkem 221 cykly kontrakce. Data AFM byla pořízena obdobným způsobem, jak je popsáno na počátku kapitoly. Snímek získaného obrazu záznamu je uveden na Obrázek 8.27. Vzhledem k umístění držáku s hrotem AFM, na kterém dochází k ovlivnění přímého laserového světla, jsou obrazy výrazně méně kontrastní a navíc s výraznějším šumem než v případě přímého laserového světla, což je patrné při srovnání se snímkem na Obrázek 8.24. Ve snímku jsou vyznačeny dvě oblasti pojmenované jako ROI1 a ROI2 cíleně různé velikosti a pozice (ROI1 – 30x30 px, ROI2 – 20x20 px) pro srovnání. Oblasti byly manuálně nalezeny a vyznačeny jako oblasti s patrnou změnou a posunem výrazných oblastí shluku jasných pixelů.



Obrázek 8.27 – Jeden ze snímků sekvence s vyznačenými oblastmi zájmu.

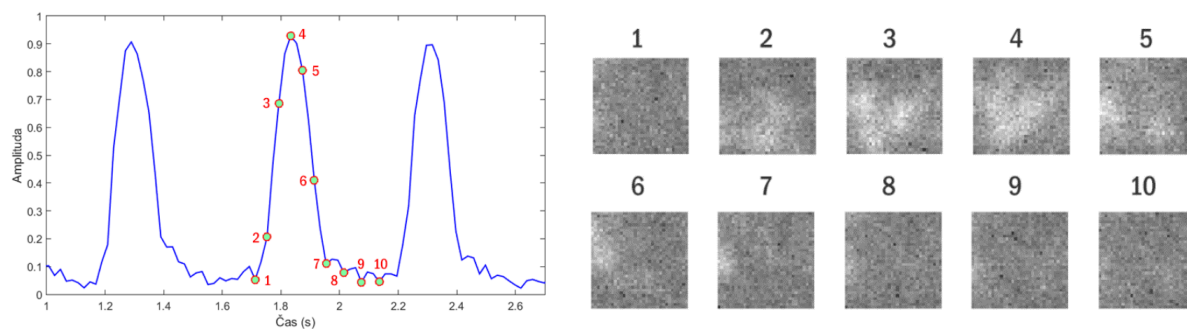
V tomto postupu extrakce signálu kontrakce z obrazu je využito předpokladu, že se shluky pixelů v čase pohybují z těchto oblastí směrem ven (stranou) a zpět anebo se shluk „ztrácí“ - klesají a rostou hodnoty pixelů v oblasti z důvodu pohybu stranou do prostoru (nikoli jen v jedné rovině). Tyto jevy nastávají současně v závislosti na směru pohybu prosvětlených oblastí v prostoru a změně jejich velikosti v čase. Počítáním sumy pixelů v oblasti zájmu je možné změny detekovat. Z výše uvedeného je patrné, že úspěšnost extrakce signálu je silně závislá na:

- 1) chování dané oblasti a tedy i na pozici zvolené oblasti zájmu,
- 2) velikosti zvolené oblasti.

S prvním bodem je spojena podmínka, kdy je nutné oblast zvolit také tak, aby při detekování změn jednoho shluku pixelů tuto oblast neovlivňoval okolní shluk, což je spojeno i s volbou velikosti oblasti. Velikost oblasti není možné volit příliš rozsáhlou, neboť se změny ve více shlucích pixelů ovlivňují anebo přímo kompenzují. Signály jsou z oblastí získány jako suma hodnot pixelů v jednotlivých snímcích sekvence.

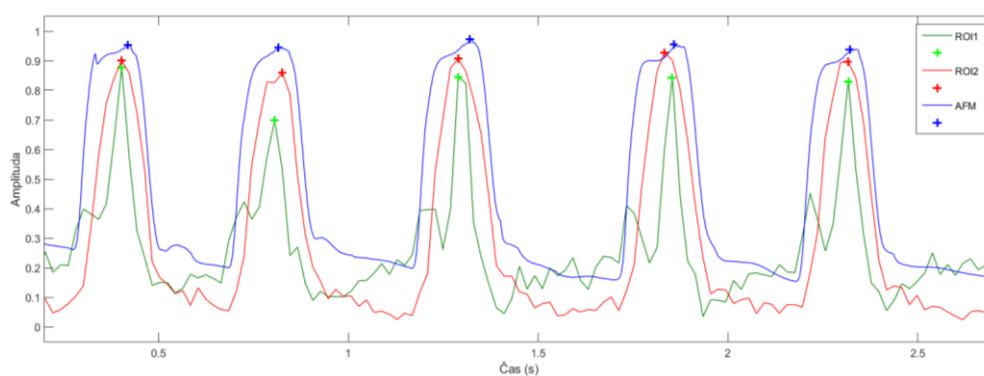
Postup s hodnocením je demonstrován na záznamu, z něhož pochází snímek na Obrázek 8.27. Ten obsahuje celkem 221 cyklů kontrakce a je v délce 94 sekund. Periody mezi tepy EB v záznamu vykazují občasnou vysokou variabilitu, jak je patrné ze záznamu AFM (Obrázek 8.30). Záznam je tak vhodným příkladem pro porovnání metod měření (z hlediska pohledu na frekvenci tepu a jeho sílu).

Příklad změn, které nastávají v oblasti ROI2 ve vybraných okamžicích, je uveden na Obrázek 8.28 vlevo. Tyto snímky o rozměru 30x30 px odpovídají 10 bodům extrahovaného signálu z této oblasti a jsou v něm dle shodného číslování vyznačeny.



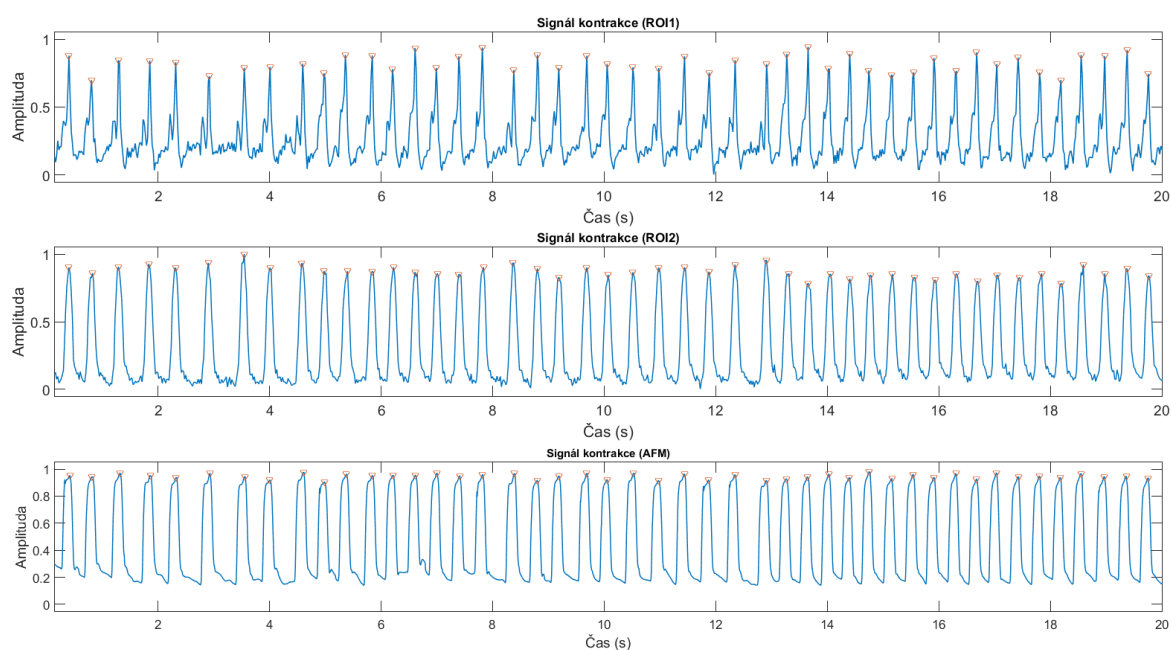
Obrázek 8.28 – Získaný signál (vlevo) s vyznačenými vybranými body a související sekvence snímků z ROI2 v těchto časech (vpravo).

Několik cyklů signálu kontrakce získaných metodou AFM a opticky z ROI1 a ROI2 jsou společně zobrazeny na Obrázek 8.30.



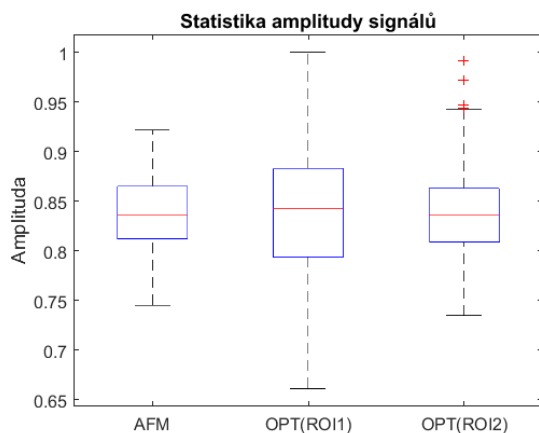
Obrázek 8.29 – Společný úsek signálů AFM a pak získaných opticky ze dvou odlišných oblastí.

Jednotlivé signály se v zobrazeném úseku liší šířkou pulzu, tvarem a amplitudou. Což je patrné i z delšího úseku (Obrázek 8.30).

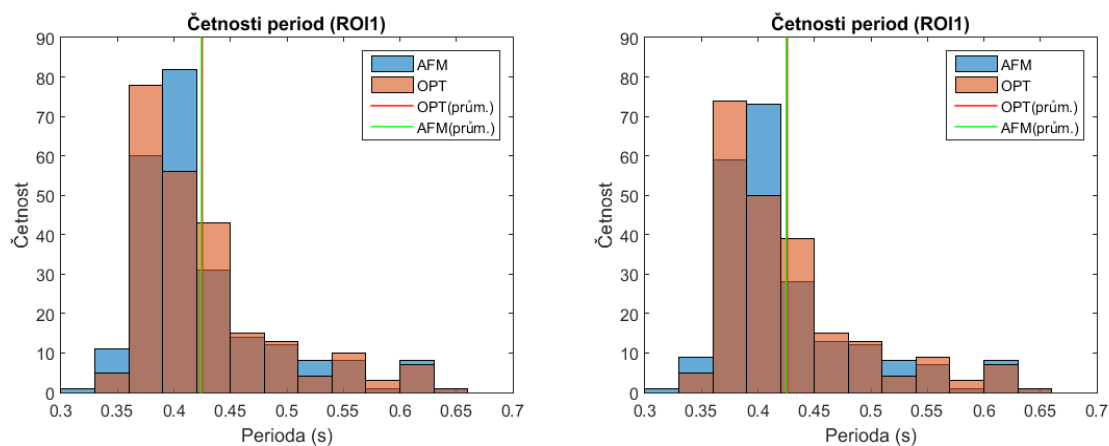


Obrázek 8.30 – Porovnání signálů AFM a signálů z ROI1 a ROI2 získaných optickou metodou.

U všech třech signálů byly získány špičky a hodnoceny obdobným způsobem, jaký je popsán na Při analýze signálů a jejich srovnání s referenčním signálem byl použit shodný postup jako v případě extrakce signálů z oblasti okrajů EB.



Obrázek 8.31 – Srovnání amplitud detekovaných špiček signálu AFM se signály z ROI1 a ROI2.



Obrázek 8.32 – Histogram period detekovaných špiček ve srovnání s AFM.

Tabulka 8.5 – Statistické kvantitativní hodnocení odchylky od referenčních hodnot AFM v detekci testované metody v případě detekce periody mezi špičkami a změny v maximálních hodnotách detekovaných špiček ve dvou oblastech (ROI1, ROI2).

Signál	Frekvence FP2P						
	Průměrná hodn. [Hz]	Nejčastější hodnota [Hz]	Odchylka [%] (prům. hodn.)	Odchylka [%] (nejč. hodn.)	Prům. odchylka [%] (jedin. hodn.)	Max. rozdíl hodnot [%]	Min. rozdíl hodnot [%]
AFM	2,3522	2,61	0,00	-	-	-	-
OPT (RO1)	2,3474	2,58	0,20	3,73	4,27	12,54	0,00
OPT (RO2)	2,3479	2,49	0,18	1,04	2,38	9,62	0,00
Signál	Amplituda PA						
	Průměrná hodn. [-]	Nejčastější hodnota [-]	Odchylka [%] (prům. hodn.)	Odchylka [%] (nejč. hodn.)	Prům. odchylka [%] (jedin. hodn.)	Max. rozdíl hodnot [%]	Min. rozdíl hodnot [%]
AFM	0,8339	0,74	0	-	-	-	-
OPT (RO1)	0,8339	0,66	0	11,27	6,80	25,82	0,02
OPT (RO2)	0,8339	0,73	0	1,35	4,29	16,54	0,01

8.4 Diskuse

Kapitola se zabývala realizací několika variant optických metod – různých přístupů k měření kontrakce iPSC shluků buněk (těles EB) optickou cestou. Metody byly rozděleny na dvě skupiny. Jsou to metoda vycházející z extrakce signálu kontrakce z detekovaného pohybu pohybující se hranice EB těles anebo metoda vycházející z pohybů interních struktur EB těles. V obou případech je k pořízení videosekvence snímků použita světelná mikroskopie, v prvním případě obvyklé zobrazení ve světlém poli a v případě druhém pak zachycení přímého a rozptýleného světla infračerveného laseru využívaného u systému AFM. AFM byl ve většině představených případů, pokud to bylo možné, použit jako referenční zdroj měření kontrakce, se kterým bylo optické měření porovnáno.

Hodnocení kontrakce z pohybující se hranice je založeno na přesné detekci této hranice a jejího pohybu. Prioritně bylo pro splnění účelu extrakce dostatečně vhodného signálu kontrakce pro další hodnocení potřeba zajistit detekci hranice v každém snímku sekvence s co nejvyšší přesností. K tomuto účelu byly testovány čtyři různé přístupy. První přístup využíval získání kontrahujícího se objektu segmentací s prostým prahováním s převedením do binární oblasti, kde došlo k úpravě objektu – vyhlazení a odstranění nežádoucích částic. Výsledkem je tedy kontrahující se část objektu (měřeného EB) oddělená od pozadí. Hodnoceným parametrem, z jehož časové změny byl získán signál kontrakce, je délka detekované hranice. Druhý přístup využívá obdobný postup, liší se ve způsobu segmentace, které v tomto případě vychází z hranové detekce. Třetí, velmi snadně realizovatelný přístup, využívá počítání sumy hodnot pixelů v oblasti zájmu. Poslední přístup využívá metody adaptivních kontur. Tyto přístupy byly pojmenovány v uvedeném pořadí zkratkami THR, EDG, PIX, SNK. Seznam uvedených přístupů je uveden v Tabulka 8.1. Postup EDG byl úplně vyřazen z analýz, neboť tímto způsobem nebylo možné vhodně extrahovat signál kontrakce. Extrahované signály v běžném nastavení i mírně obměně nastavení nevykazovaly tvarovou a frekvenční podobnost se signály kontrakce získanými ostatními přístupy. Hodnocení přesnosti u jednotlivých postupů bylo provedeno na základě získaných signálů a jejich analýzy. V extrahovaných signálech byly detekovány špičky. U série získaných špiček byly hodnoceny jejich časové vzdálenosti FP2P a jejich získané maximální hodnoty (v amplitudě). U získaných hodnot byly hodnoceny odchylky průměrných hodnot FP2P od průměrných hodnot, obdobně získaných u signálu kontrakce pořízeného AFM. Stejným způsobem byl porovnán medián těchto spekter získaných frekvencí jednotlivých signálů (získaných opticky a referenčního). Z výsledků vyplývá, že s využitím postupů PIX, THR a SNK je možné porovnáním s AFM dosáhnout frekvencí s odchylkou pouze 0,08 % u PIX, 0,06 % u THR a vyšší odchylku vykazuje metoda s postupem SNK, konkrétně ve výši 2,29 %. Jinak je tomu u mediánu – PIX a SNK vykazují odchylky pouze v desetinách procenta, zatímco se THR odchyluje o 3,57 %. Tyto hodnoty – průměrná hodnota FP2P a medián FP2P – vypovídají o celku, o celém souboru a jeho vybrané frekvence. Druhý přístup hodnocení byl založen na porovnání jednotlivých špiček. V tomto případě byly porovnávány vždy jednotlivé špičky (na jednotlivých pozicích) získané postupy PIX, THR a SNK. U všech tří přístupů se nachází průměrná odchylka rozdílů vzdáleností jednotlivých dvojic špiček (porovnávané a referenční) v intervalu mezi 2 a 3 %. Uvedené hodnoty lze vyčíst z Tabulka 8.3. Z těchto dosažených hodnot lze vyvodit, že přesnost detekce špiček a při průměrném hodnocení jejich vzdáleností je v případě všech tří metod vysoká. Z vypočteného maximálního (procentuálního) rozdílu hodnot od jednotlivých špiček detekovaných v AFM je patrná vysoká odchylka některých špiček až o 24,40 % (pro THR) a nejméně 8,68 % (pro PIX), ty však nejsou podstatné při hodnocení průměrné frekvence anebo mediánu celku detekovaných vzdáleností špiček. V případě získaných hodnot maxim detekovaných špiček byly hodnoceny odchylky jednotlivých hodnot. Průměrné hodnoty PA nebylo možné hodnotit, neboť signály mají odlišnou a

charakter amplitudy. Naopak u jednotlivých signálů bylo nutné vypočíst průměrnou amplitudu špiček a signály dle této hodnoty vyrovnat (zvýšením úrovně) se signálem AFM, aby bylo možné v následující fázi signály adekvátně srovnávat. Rozborem jednotlivých špiček a nalezených maxim ve špičkách byly získány průměrné odchylky pro PIX, THR a SNK v rozmezí 6,44 až 7,83 %. Nejvyšší odchylka se týká metody THR a nejnižší PIX. Dá říci, že odchylky a tedy přesnost určení maxim špiček u jednotlivých postupů jsou srovnatelné. Maximální odchylky se pohybují v intervalu 17,29 až 29,85 %, největší odchylky jsou přiřazovány metodě THR, nejmenší SNK. Výsledky jsou znázorněny v Tabulka 8.3.

V dalším kroku byla představena shodná analýza, která vycházela z výběru širší oblasti snímku (ROI0) – oblasti obsahující artefakty v hraniční oblasti obrazu EB. V předchozím případě byla hodnocena oblast užší bez těchto artefaktů (ROI1). V hraniční části jsou patrné tři jevy – rozmazaná oblast, nespojitý úsek hranice a malá oblast s expanzí kardiomyocytů ze základní úrovně tělesa EB. Tyto artefakty mohou způsobovat nepřesnost při detekci. Tento předpoklad byl ověřován a výsledky jsou patrné z Tabulka 8.4. Výsledky lze porovnat s výše uvedenými pro užší oblast detekce. U hodnoceného parametru frekvencí FP2P se výrazně zvýšila průměrná odchylka od AFM z 0,06 % na vysokou hodnotu 5,70 %. Stoupla také její maximální odchylka, a to na 78,22 %. U ostatních postupů zůstaly hodnoty přibližně na původní úrovni. V případě detekce maximálních hodnot špiček je jsou výrazné změny patrné opět jen u postupu THR. Z výsledků je patrné, že metody PIX a SNK jsou méně náchylné na vnější podmínky. Zejména nejsou náchylné na rozsah zvolené oblasti zájmu, ve které dochází k detekci hranice. Metoda THR je závislá na velikosti a pozici oblasti zájmu s přímou závislostí na přítomnosti spojitě hranice s absencí nerovností, které značně snižují přesnost metody. Dá se říci, že přesnost detekce u THR není, anebo je zanedbatelně závislá na volbě ROI, v případě, že v různých zvolených oblastech, kde nastává detekce, vykazuje hranice obdobné vlastnosti (spojitost, ostrost, homogenitu). To potvrzuje Obrázek 8.18 a s ním spojené analýzy. Přesnost THR je však možné také zvýšit úpravou nastavení výpočetních parametrů či zařazením přídatných kroků obrazového zpracování. Tyto potřeby však není nutné řešit u metody PIX, která je velice jednoduchá pro nastavení a výpočet. Nepřesnosti u metody PIX však mohou nastat, pokud bude současně docházet k interním změnám ve struktuře objektů EB, neboť tyto další změny v intenzitě pixelů v různých oblastech mohou ovlivňovat hodnocený součet hodnot pixelů, na čemž je metoda založena. Velmi dobré výsledky vykazuje také postup s metodou SNK. Metoda aktivních kontur však vyžaduje oproti PIX individuální nastavení pro zpracování konkrétních videosekvencí. Postrádá tak univerzálnost.

Celkově je dle výsledků a zkušeností možné shrnout takto: Metoda zahrnující postup EDG je velice citlivá na nastavení, vykazuje vysokou chybovost detekce hranice EB v navrženém postupu. Chybovost je způsobena zejména přítomností pouze jedné hrany, která vykazuje variabilitu pixelů v okrajové části (v hraniční části) a častou neostrost hranice. Metoda s postupem PIX je výpočetně jednoduchá, s minimálními nároky na nastavení vstupních parametrů, s absencí řady kroků, které ostatní postupy vyžadují (převod na černobílý snímek, oddělení pozadí, vyhlazení hranice a podobně). V některých případech však může být kvalita získaného signálu závislá na množství šumu v obraze nebo přítomnosti změn v intenzitě pixelů uvnitř oblasti EB, pokud se v sekvenci snímků vyskytují změny vnitřní struktury EB. Metoda THR je zaměřena čistě na detekci hranice EB a hodnocení signálu ze změny délky této hranice. Je tak citlivá na kvalitu přechodu mezi objektem (EB) a pozadím. Nesouvislost hranice, nerovnosti na hranici a různé artefakty v oblasti hranice způsobují nepřesnost v detekci. Metoda SNK je technicky a výpočetně nejnáročnější metodou, vyžaduje přesné nastavení, mimo tyto nevýhody naopak vykazuje velmi dobré vlastnosti a přesnost. Lze ji považovat z více univerzální než PIX, neboť není do takové míry (jako PIX) závislá na vnitřních změnách v detekovaném objektu v případě změn vnitřní struktury EB v čase. Celkově lze testovanou metodu založenou na detekci hranice objektu EB a délce její změny v čase (resp. velikosti obrazu EB v čase) považovat za

velice přesnou a perspektivní ve srovnání ve schopnosti přiblížit se vlastnostem kontaktní metody AFM. Metoda je však silně závislá na kvalitě mikroskopického zobrazení a kvalitě pořízených obrazů. V případě adherovaných rozrostlých struktur kardiomyocytů v EB, kdy není přítomna jasná kontrastní hranice EB, metoda selhává. Pro tento účel byla představena technika založená na vhodném zaostření a zvýšení intenzity jasu průchozího světla. Ta ve výsledku výrazně zvyšuje kontrast hranice, nebylo však prokázáno za jakých podmínek a jakých příkladech je postup vhodný.

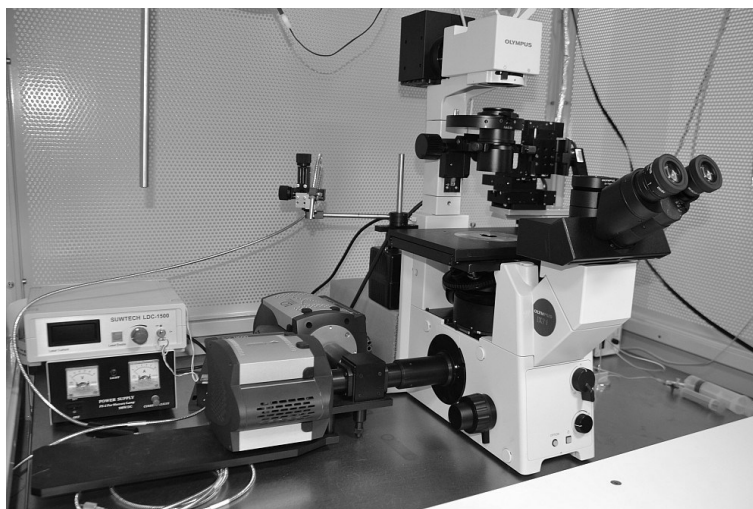
Druhou metodou, která může najít uplatnění i v náročnějších podmínkách popsaných výše, je metoda založená na detekci pohybu vnitřních struktur shluků kardiomyocytů s využitím infračerveného laserového světla využívaného v zařízení mikroskopie atomárních sil. Navržená výpočetně snadná metoda založená na extrahování signálu kontrakce výpočtem sumy hodnot pixelů v oblasti zájmu se ukázala jako velmi přesná a přesností přibližně odpovídá metodě s postupem PIX u předešlé varianty využití u detekce hranice měřeného objektu. Příkladem může být odchylka průměrné frekvence ze spektra frekvencí detekovaných špiček oproti AFM, která byla menší než 0,2 %. Metoda je však silně závislá na výběru měřené oblasti (pozici a velikosti), který probíhá ručně na základě sledovaných změn ve videosekvenci. Výběrem jiné oblasti došlo ke zvýšení chybovosti až na dvojnásobek. V extrémním případě, ve výběru nevhodné ROI není možné signál z oblasti extrahovat. Není však vyloučeno, že je možné s využitím vhodným postupů možné tyto kroky zaměřené na výběr oblasti automatizovat.

9 Praktická část C – Optické metody měření kontrakce kardiomyocytů

9.1 Technické řešení zařízení

První část kapitoly se začíná s navrženým základním postupem pro měření kontrakce kardiomyocytu a vápníkových transientů u kardiomyocytu, který se přibližuje obecně známým postupům. Následně cílí na možnosti současného měření těchto dvou funkčních parametrů s využitím k tomu vyvinutého optických zařízení - vícekanálových optických adaptérů. Jedná se o optický adaptér pro promítání spektrálně oddělených obrazů na dvě kamery současně, v druhém případě o optický adaptér založený na zpětném promítání spektrálně rozděleného obrazu na obrazový čip jedné kamery. Obě optická zařízení autorů V. Čmiel a I. Provazník jsou registrována pod názvy *Adaptér pro promítání spektrálně rozděleného obrazu na jeden obrazový snímač* a *Adaptér pro promítání spektrálně rozděleného obrazu do dvou digitálních kamer* na Úřadu průmyslového vlastnictví.

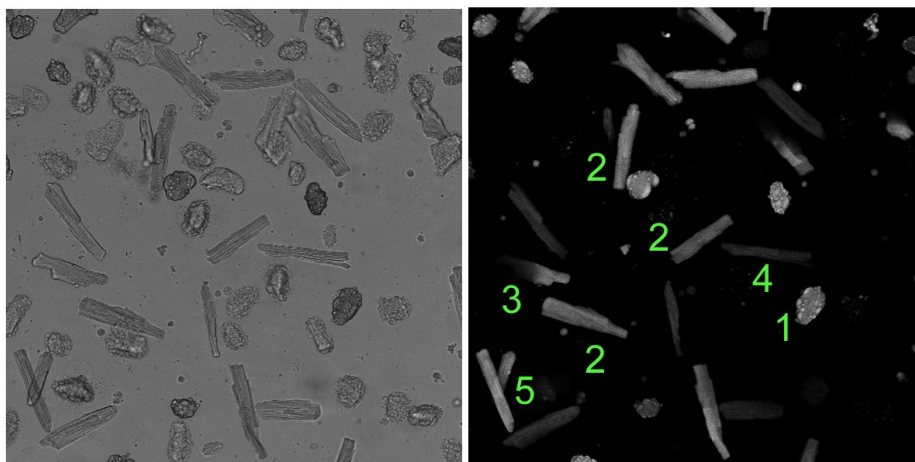
Další část kapitoly je následně zaměřena na vývoj vlastních metod určených pro stabilní a přesné měření kontrakce srdečních buněk s využitím metody detekce konců nebo fluorescenční metody. K měření zmíněných funkčních parametrů dochází na fluorescenčním mikroskopu Olympus IX-71 rtuťovým fluorescenčním zdrojem, potřebnou sadou filtrů pro měření fluorescence barviv v červené a zelené oblasti spektra a vybaveného fluorescenčními kamerami Andor iXon 860 a Andor iXon Ultra 897. Součástí je vyvinutý, řízený stimulační systém zapsaný jako užitný vzor u Úřadu průmyslového vlastnictví (CHMELAR, M.; ČMIEL, V.; *Vysoké učení technické v Brně, Brno, CZ: Ovládací obvod pro spínání stimulačních impulzů*. č. 25633, 2013). Kardiomyocyty byly uchovávány a měřeny v Tyrodově roztoku v Petriho misce o průměru 35 mm.



Obrázek 9.1 - Pracoviště zahrnující fluorescenční mikroskop IX-71 s optickým adaptérem určeným pro rozbočení výstupního světla na dvě kamery a kamery Andor iXon Ultra 897 a Andor iXon 860.

Experimenty probíhaly na izolovaných kardiomyocytech dospělého potkana, jejichž izolace a charakter byl zmíněn v kapitole 1.1. Skupinu kardiomyocytů získaných jako sediment umístěných v nízkovápníkovém Tyrodově roztoku zobrazuje Obrázek 9.2. Buňky lze z filtrovaného sedimentu získat s různou koncentrací. V závislosti na časovém odstupu od izolace a na vnějších podmínkách je v celé skupině přítomna jen malá část vitálních funkčních kardiomyocytů. Ty lze identifikovat dle tvaru, ale také dle schopnosti vykazování fyziologických dějů (vápníková signalizace, kontrakce). To lze ověřit vhodnou stimulací. Nefyziologické kardiomyocyty vykazují nevhodné procesy, jako jsou vápníkové vlny anebo pomalé či neúplné stažení při kontrakci. Množství kardiomyocytů z tvarově vyhovujících pro

pořádání experimentů tvoří jejich zlomek, jedná se o jednotky kardiomyocytů v celé misce. Pro tento účel byly prováděny rozsáhlé analýzy viability kardiomyocytů s využitím konfokálního mikroskopu Leica TCS SP8X s využitím Calceinu jako indikátoru viability. Metoda byla publikována v [143]. Ukázka takto značených kardiomyocytů je uvedena na Obrázek 9.2. Experimentálně bylo zjištěno, že kardiomyocyty mají vysokou viabilitu a funkčnost do 4 až 6 hodin po izolaci a uložení do nízkovápníkového Tyrodova roztoku.

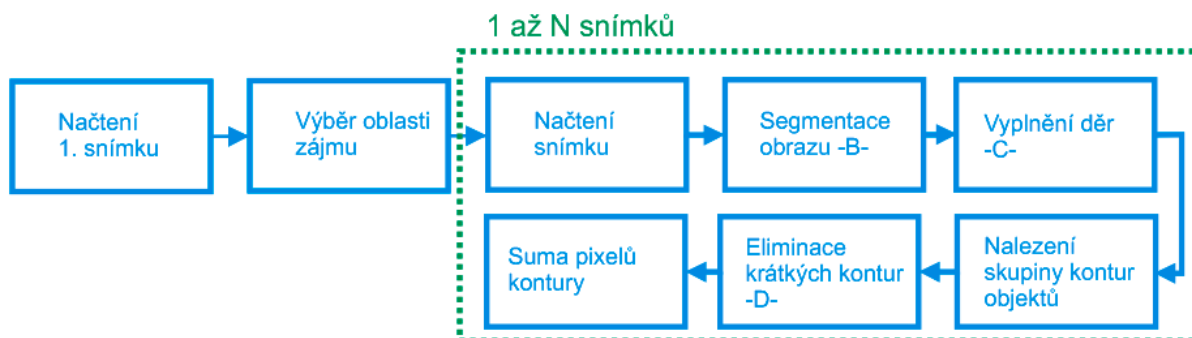


Obrázek 9.2 – Zorné pole se skupinou tvarově vyhovujících (protáhlých s výraznou charakteristickou strukturou) a viabilních kardiomyocytů spolu s již mrtvými kardiomyocyty. Snímek je pořízen konfokálním mikroskopem Leica TCS SP8X s vysokým rozlišením 3200x3200 px ve světlém poli spolu s fluorescenčním snímek s kardiomyocyty obarvenými Calceinem. 1 – mrtvý kardiomyocyt, 2 – kardiomyocyt tvarově i viabilně vyhovující, 3 – kardiomyocyt prostorově natočený, 4 – kardiomyocyt vyhovující tvarem ale s nízkou úrovní viability, 5 – překryté kardiomyocyty. Vhodnou skupinou pro další analýzu jsou kardiomyocyty značené 2.

9.2 Měření kontrakce izolovaných kardiomyocytů

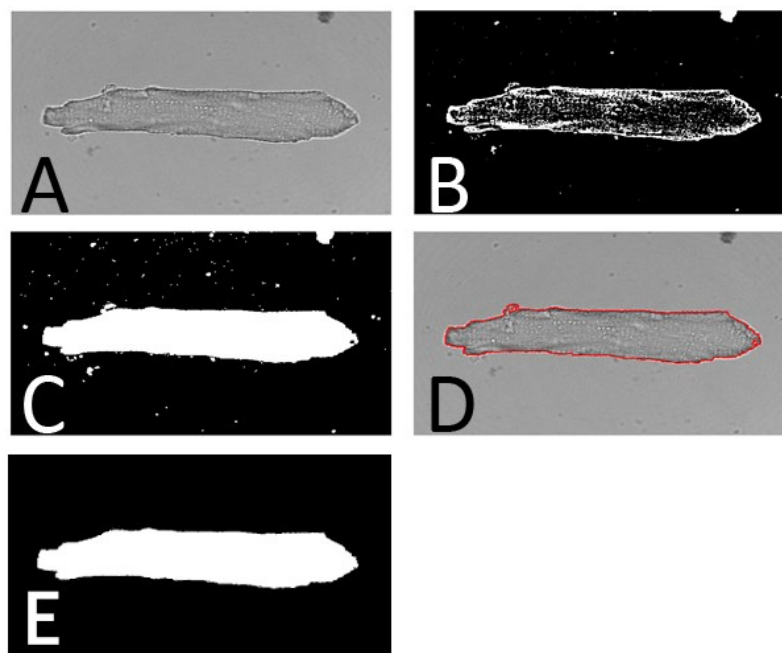
V běžných postupech používaných pro získání signálu kontrakce z celé buňky jsou užity kroky vedoucí k odstranění pozadí (obsahující malé objekty a variabilitu pixelů danou šumem) a k nalezení konců anebo kontury získaného pro extrakci signálu kontrakce. Pro nalezení kontury izolovaného kardiomyocytu potkana ze snímku pořízeného ve světlém poli byl vytvořen algoritmus uvedený na Obrázek 9.3. Pokud je uvažován dostatečně kontrastní snímek kardiomyocytu, s využitím segmentace na základě prostého prahování je získán binární obraz obsahující sarkolemu kardiomyocytu s patrnými zakončeními v sarkolemě v místech původních spojů mezi kardiomyocyty a také nežádoucí objekty, jako jsou prachové částice či bubliny v médiu (Obrázek 9.4 B). Vyplnění děr ve sledovaném objektu s využitím morfologických funkcí, konkrétně s využitím morfologické dilatace, je získána skupina objektů v obraze, u kterých jsou nalezeny kontury. Z nalezené sady kontur jsou eliminovány všechny kontury mimo konturu nejdelší, která odpovídá měřenému kardiomyocytu (Obrázek 9.4 D). Alternativně je vhodné nejdříve (před krokem nalezení kontur) odstranit s využitím morfologické eroze malé objekty a následně je tak nalezena pouze jedna kontura měřeného objektu (Obrázek 9.4 E). Tento přístup je na zvážení v závislosti na množství a charakteru malých objektů. Tento krok totiž může způsobit vedlejší efekt, kdy je morfologickou erozí do jisté míry odstraněná část hraničních pixelů objektu kardiomyocytu. Na druhé straně může mít tento krok pozitivní účinek ve vyhlazení hranice, pokud obsahuje různé nerovnosti. Protože je zařazení tohoto kroku závislé na charakteru obrazu kardiomyocytu. Tento postup je proveden pro 1 až N celkového počtu snímků kardiomyocytu ve video-

sekvenci. V případě přítomnosti větších objektů, např. jednoho či více dalších kardiomyocytů, je nejdříve načten první snímek a uživatelsky zvolena oblast zájmu obsahující měřený kardiomyocyt.

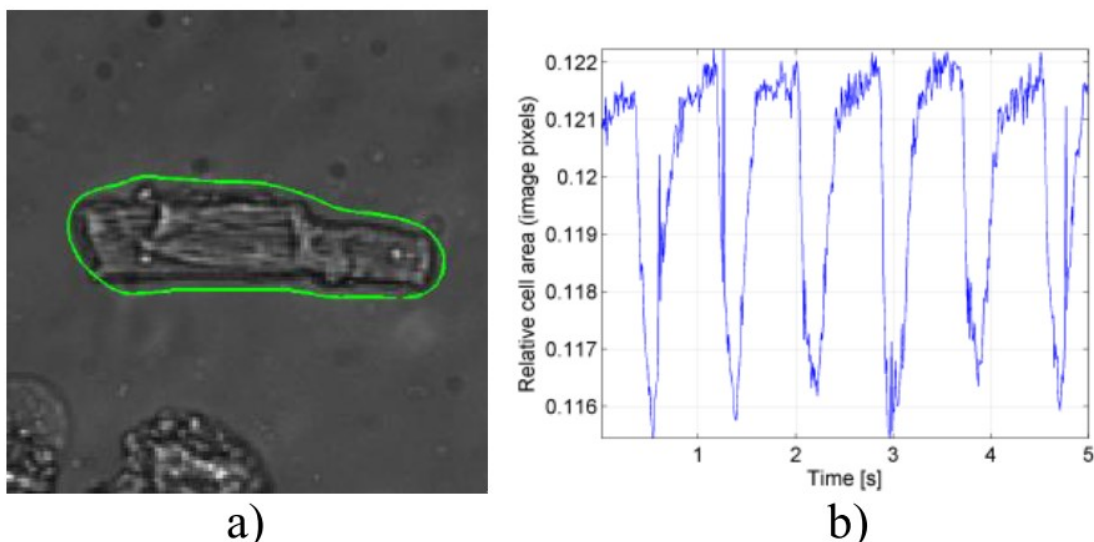


Obrázek 9.3 – Navržený algoritmus pro eliminaci pozadí a nalezení kontury sledovaného kardiomyocytu. Dodatek s písmeny u některých bloků označuje odpovídající snímek na Obrázek 9.4.

Segmentace obrazu může být provedena také řadou dalších postupů. Výčet variant segmentací obrazů s analýzou jejich využití a vlastností je uveden v [144]. Jeden z velmi podobných postupů sestává z využití segmentace na základě hranové detekce. Ostatní postup je shodný, výsledek oproti postupu se segmentací na základě prostého prahování se liší v závislosti na typu a vlastnostech snímků kardiomyocytů. Detekce po segmentaci na základě prostého prahování se prakticky ukázala být stabilnější a přesnější. Alternativně byl testován také přístup s využitím metody aktivních kontur. Výsledek nalezené kontury a extrahovaného signálu je uveden na Obrázek 9.5 (zdroj: publikovaný článek [67]). Oba uvedené typy algoritmů mají značnou výhodu v možnosti automatizace procesu nalezení měřeného objektu a jeho analýzy, a to na rozdíl od metody detekce konců s potřebou natočení kardiomyocytu do horizontální polohy jeho podélnou osou.



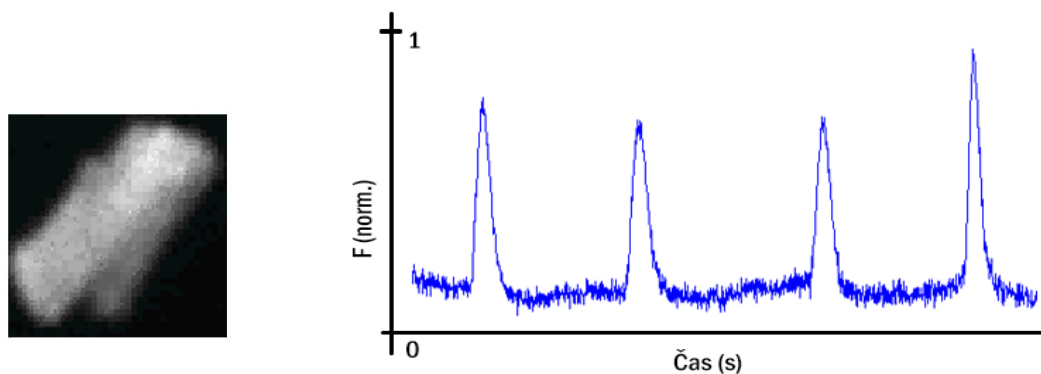
Obrázek 9.4 – Obrázek demonstrující postup v algoritmu uvedeném na Obrázek 9.3. Snímek A byl pořízen na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8 X s využitím kontrastní metody DIC v rozlišení 1600x800 px.



Obrázek 9.5 – Aplikace metody aktivních kontur pro nalezení kontury sledovaného kardiomyocytu (a), výsledný signál před filtrací extrahovaný jako součet pixelů uvnitř nalezené kontury v 5s úseku. Postup byl publikován v [67]

9.3 Měření vápníkových transientů u izolovaných kardiomyocytů

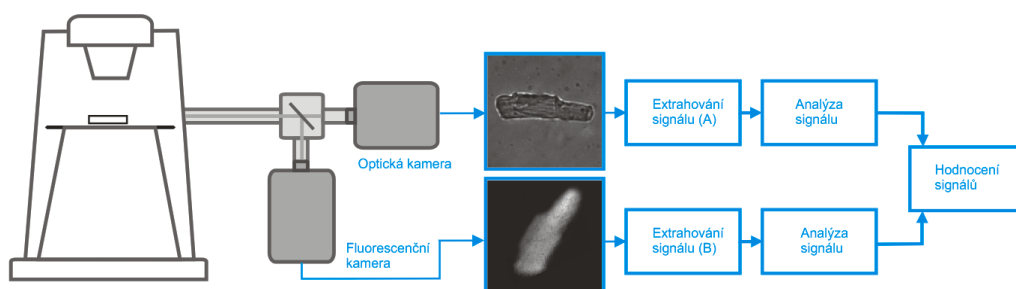
Vápníkové transienty jsou průměrem vitálních vápníkových elementárních dějů a je proto potřeba zajistit vhodnou oblast, ze které jsou z obrazu kardiomyocytu měřeny vápníkové transienty u izolovaných kardiomyocytů je vhodné pro hodnocení vápníkových transientů oblast zahrnující celý měřený kardiomyocyt. V případě zvolení užší oblasti se může projevit negativní vliv pohybového artefaktu při stahování konců nastávající při kontrakci. Při měření nehraje roli rozlišení snímáče. Rozlišení musí být pouze tak vysoké, aby bylo možné v případě přítomnosti ostatních objektů v obraze, do kterých vnikly vápníkové indikátory a ovlivňují měřený fluorescenční signál u sledovaného kardiomyocytu, tyto objekty eliminovat výběrem vhodné oblasti zájmu. Příklad získaného snímku je uveden na Obrázek 9.6. K pořízení byla použita EMCCD kamera Andor iXon 860 s rozlišením 128x128 px. Kardiomyocyt v tomto případě zaplňuje velkou část oblasti snímáče. Signál je získán jako suma pixelů v oblasti v každém časovém okamžiku. Získaný signál musí být podroben normalizaci, a to vhodně, např. do hodnot 0 až 1. Signál je následně hodnocen jako $\Delta F/F_0$, kde ΔF je časově proměnná část fluorescenčního záření a F_0 je fluorescence vázaného vápníku a vápníku na pozadí. Je to tedy zbytková fluorescence bez přítomnosti složky ΔF ; v signálu odpovídá pozici minimální hodnoty vápníkového transientu. Dosaženo je tak signálovým zpracováním, a to nalezením počátečních a koncových bodů vápníkových transientů v každém cyklu excitace-kontrakce a následným odečtením rozdílu amplitudy získané v tomto bodě (jako rozdíl od nuly) pro každý bod v aktuálním cyklu signálu.



Obrázek 9.6 – Fluorescenční snímek kardiomyocytu pořízený kamerou Andor iXon 860 s rozlišením 128x128 px. Snímek obsahuje maximální fluorescenci vápníkového transientu s využitím vápníkového indikátoru Fluo-4. Napravo je ukázka získaného normalizovaného signálu vápníkových transientů (celkem 4 cykly) bez filtrace signálu.

9.4 Současné měření kontrakce a $[Ca^{2+}]_i$

Varianty opto-mechanické úpravy výstupu s obrazy s pomocí optických adaptérů byly publikovány v [61] a blíže se jí věnuje kapitola 5, praktické realizaci pak kapitola 5.3. V uvedené kapitole jsou představeny také fyzické realizace s ukázkou připojených kamer. Algoritmus vhodný pro měření s využitím optického rozbočovače a dvou kamer je schematicky znázorněn na Obrázek 9.7. V ukázce jsou použity reálné snímky pořízené kamerami Andor iXon Ultra 897 (optická kamera, zobrazení ve světlém poli) a Andor iXon 860 (fluorescenční kamera) se snímkovací rychlostí 80 fps na fluorescenčním mikroskopu Olympus IX-71. Jako vápníkový indikátor byl použit indikátor Fluo-4 AM.



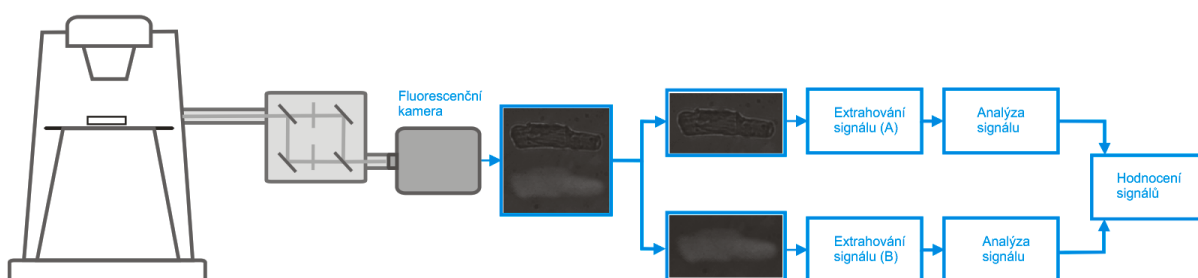
Obrázek 9.7 – Principiální schéma postupu a použitých algoritmů při současném měření kontrakce izolovaných srdečních buněk spolu s vápníkovými transienty.

Schéma zahrnuje optický mikroskop s připojeným adaptérem a dvojicí kamer. S pomocí výpočetní techniky je zajištěna akvizice synchronizovaná sekvence dvojic obrazů – snímků se zobrazením ve světlém poli a fluorescenčních snímků. Synchronizace je zapotřebí dvěma způsoby: - v první řadě je pomocí externího spouštěcího impulsu zapotřebí spustit akvizici oběma kamerami ve stejný okamžik, - následná synchronizace snímků, pokud se jednotlivé kamery odlišují snímkovací rychlostí, a to např. interpolací hodnot získaného signálu. U optické kamery je vzhledem k použité metodě detekce nutné kardiomyocyt natočit, např. do vodorovné polohy u běžně používané metody detekce konců. Natočení se provádí fyzickým otočením kamery Andor, systém kamera-mikroskop je k tomu dostatečně přizpůsoben. Pozice kardiomyocytu v obraze pořízeného fluorescenční kamerou je libovolná. Za to je potřeba nastavit zvětšení na mikroskopu tak, aby vzhledem k relativně malému rozlišení kamer možné využít prostor snímáče v co největším měřítku. Nyní je postup obdobný jako při samostatném měření kontrakce a vápníkových transientů. Vápníkové transienty jsou získány jako intenzita jasů fluorescence

z celé oblasti, která odpovídá sumě pixelů v jednotlivých snímcích, a následnou úpravou signálu hodnoceny jako $\Delta F/F_0$. Hodnocení může probíhat kompletním rozměření a hodnocením získaných funkčních parametrů (viz již navržené řešení uvedené v kap. 0). K extrahování signálu kontrakce může být využit jakýkoli postup, a to v případě analýzy obrazu při zobrazení ve světlém poli, anebo může být využita i dále popsaná fluorescenční metoda měření kontrakce.

Podstatným faktem figurujícím při současném měření je potřeba nastavení velmi nízkého osvětlení, neboť vzhledem k možným filtrům s nedokonalou blokadí světla v nepropustné oblasti může dojít k ovlivnění fluorescenčních snímků průchozím světlem použitým pro zobrazení ve světlém poli. Detekce ve světlém poli tak klade vysoké nároky na detekční algoritmy. K tomuto účelu byly vyvinuty dva algoritmy – algoritmus založený na detekci konců s úpravou obrazu ostřením a fluorescenční metoda, které jsou popsány v dalším úseku kapitoly.

Současné měření kontrakce a vápníkových transientů s využitím optického adaptéru pro současné promítání spektrálně oddělených obrazů na jeden obrazový čip znázorňuje schéma na Obrázek 9.8.



Obrázek 9.8 – Schéma pro současné měření kontrakce a vápníkových transientů s využitím jedné kamery a optického adaptéru realizujícího spektrální rozdělení a zpětné promítnutí dvou obrazů na jeden čip kamery.

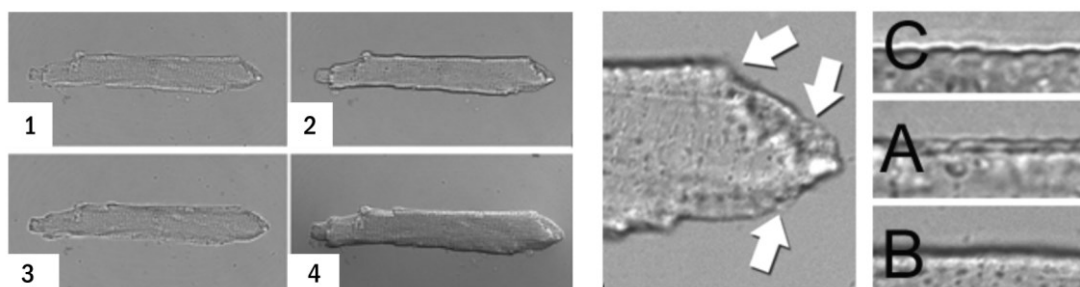
Postup v mnoha částech odpovídá výše popsanému postupu zpracování obrazů. Adaptér však způsobí promítnutí dvou obrazů vedle sebe. Proto je vyžadováno vhodné natočení objektů a nastavení vhodného zvětšení na mikroskopu, aby měřené objekty nepřesahovaly hranici obrazového senzoru a navzájem se nepřekrývaly. Fluorescenční obraz je však mírně větší než optický obraz (světlé pole), neboť je mimo oblast kardiomyocytu, v přesahu jeho hranice zobrazována rozptýlená fluorescence. V případě horizontálního či vertikálního zarovnání kardiomyocytu s vhodným zvětšením tak, aby žádný z objektů nepřesahoval středovou hranici (hranici v polovině čipu) lze v následujícím postupu snadno získat separátní snímky rozdělením původního obrazu na dvě poloviny, jak je patrné z ukázky na Obrázek 9.8.

Dle nákresu na Obrázek 4.18 se však překrývají pozadí jednotlivých snímků. Z tohoto důvodu je jsou snímky určené k analýze ve velmi špatné kvalitě oproti obdobným snímkům získaným odděleně dvěma kamerami v předešlém případě. Vykazují malý kontrast a vysokou úroveň šumu.

9.5 Metoda detekce konců

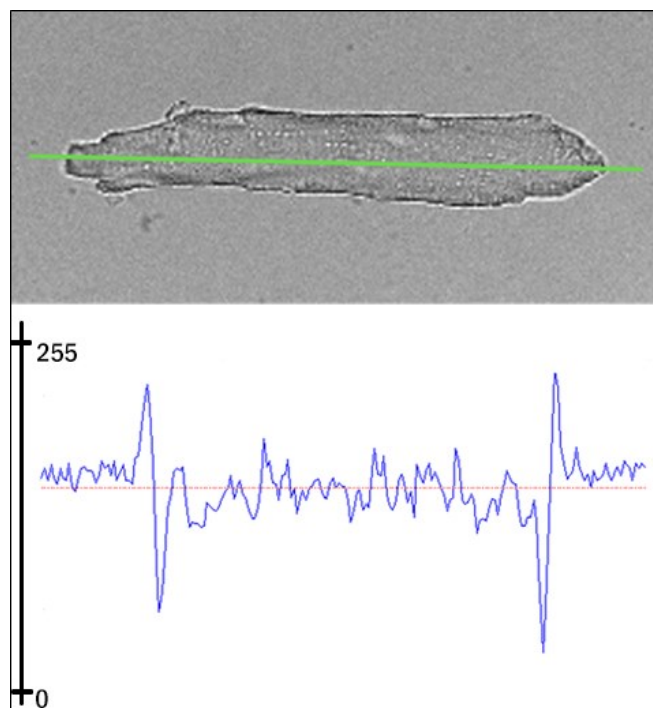
Běžné metody vedoucí nalezení kontury kardiomyocytu v obraze pro hodnocení kontrakce jsou v mnoha případech málo stabilní a mnohdy silně závislé na různých podmínkách, jako jsou kontrast kardiomyocytu vůči pozadí, typ zobrazovací metody anebo jsou značně citlivé na množství šumu v obraze. V této a následující kapitole jsou proto představeny dvě metody, které popisují postupy a algoritmy pro spolehlivější způsob detekce. Na Obrázek 9.9 je zobrazen izolovaný kardiomyocyt různým způsobem zobrazení – v zaostření na základní rovinu kardiomyocytu na misce (1) a

s přeostrněním pod a nad tuto rovinu (3 a 2), v posledním snímku (4) je pak zobrazen pomocí diferenčního interferenčního kontrastu (DIC).



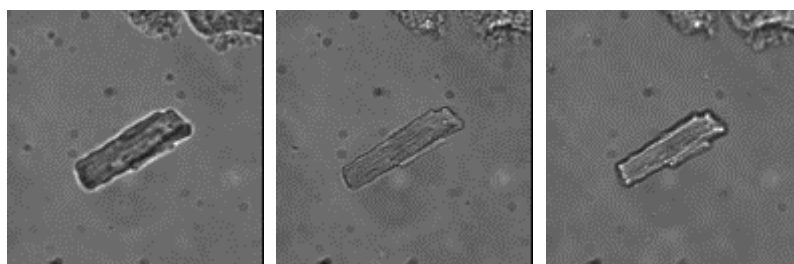
Obrázek 9.9 – Kardiomyocyt pořízený na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8 X v rozlišení 1600x800 px (případně s užším výřezem) s různou rovinou zaostření a pomocí DIC. Napravo je zobrazen pravý konec kardiomyocytu a nespojitě či málo kontrastní úseky. A – sarkolema v případě zaostření na úroveň kardiomyocytu, B – sarkolema při zaostření pod úroveň kardiomyocytu, C – sarkolema při zaostření nad úroveň kardiomyocytu.

Na pravé části obrázku jsou šipkami zobrazeny úseky, které jsou v obraze patrné často v oblastech zakončení kardiomyocytů (v oblasti původních vazeb na okolní buňky ve tkáni). Tyto úseky sarkolemy vykazují nespojitost, nebo velmi malý kontrast a jsou velmi obtížně detekovatelné. Jak už bylo zmíněno v kap. 4.2, kontrastní techniky (DIC, fázový kontrast a jiné) nejsou vhodné pro současné měření s více dalšími parametry opticky, neboť dochází ke zkreslení v optické cestě (např. u fluorescenčního snímku dochází k útlumu záření). Proto byl navržen postup, který využívá při pořízení snímků vlastnosti různé úrovně zaostření. Experimentálně bylo zjištěno a ověřeno, že zaostřením nad úroveň kardiomyocytu vzniká snímek sarkolemy se zatměním (skupinou pixelů s malou hodnotou) v její úzké okrajové části a okolo této hranice vzniká výrazné světlé okolí. Příklad takového snímku je zobrazen na Obrázek 9.10. Signál vzniklý jako profil úsečky vynesené v podélné ose kardiomyocytu je charakteristický dvojicí špiček – kladné a záporné – na koncích kardiomyocytu. Tyto špičky mají vždy souslednost kladná-záporná na levém konci a opačně na druhém konci. Tento typ získaného signálu a jeho popsané vlastnosti mohou být výhodně použity k detekci konců kardiomyocytu a hodnocení kontrakce ze vzdálenosti konců a její změně při kontrakci.



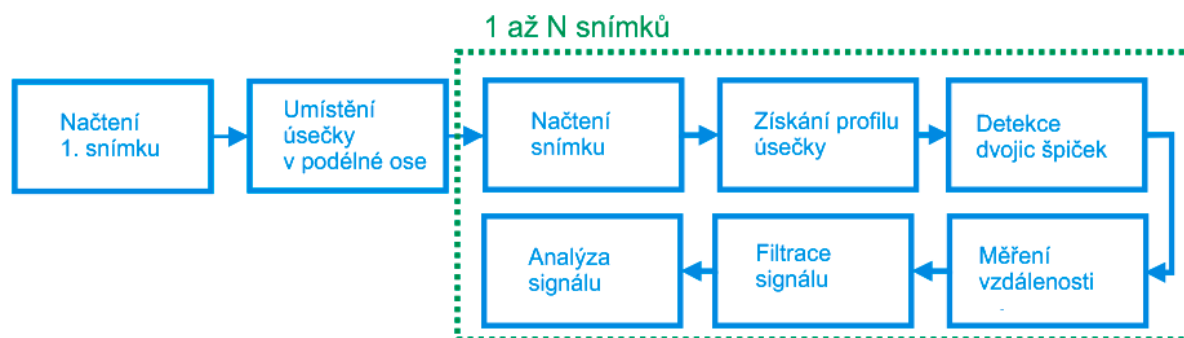
Obrázek 9.10 – Snímek kardiomyocytu se zaostřením nad hlavní optickou rovinu pořízený mikroskopem Leica TCS SP8 X v konfokálním režimu. Přes kardiomyocyt je přetažena úsečka (zeleně), které odpovídá níže uvedený profil pixelů v úsečce. Spojnicová čára vyznačuje hodnoty pixelů v rozsahu celé úsečky s hodnotami v rozsahu od 0 do 255, červená přerušovaná přímka obsahuje jejich průměrnou hodnotu (vyznačenou v celém rozsahu úsečky).

Obdobně lze charakter obrazu při přeostržení sledovat u jiného kardiomyocytu, jehož obraz byl získán kamerou Andor iXon 860 v rozlišení 128 x 128 px. Na snímcích kardiomyocytu (Obrázek 9.11) je zobrazen snímek se zaostřením nad základní úroveň (vlevo), na základní úroveň (uprostřed) a pod tuto úroveň (vpravo). Efekt, který byl v předchozí části popsán je výrazný, neboť CCD kamera s využitím optické mikroskopie (nikoli s konfokálním režimem) zabírá optickou rovinu mnohem větší tloušťky.



Obrázek 9.11 - Snímky kardiomyocytu se zaostřením nad základní úroveň (vlevo), na základní úroveň (uprostřed) a pod tuto úroveň (vpravo)

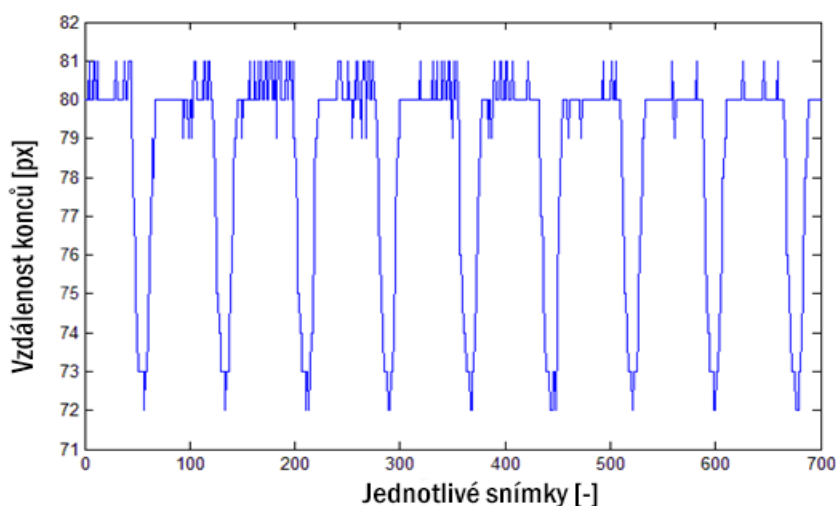
Schéma pro navrženou metodu je zobrazeno na obrázku Obrázek 9.12. Po načtení prvního snímku je manuálně vyznačena, umístěním dvou bodů, úsečka. V další fázi probíhá zpracování 1 až N snímků v cyklu. V pozicích bodů úsečky jsou v každém snímku odečteny hodnoty pixelů a získán signál profilu úsečky (Obrázek 9.10 dole).



Obrázek 9.12 – Schéma základní verze metody pro detekci konců z využitím získání profilu úsečky a nalezení konců v signálu.

Profil úsečky je následně podroben analýze. V běžném případě je možné použita varianta často používaná v publikacích v případech detekce konců sestávající ze stanovení prahové hodnoty pro zachycení špiček na koncích kardiomyocytů. Aby bylo možné využít kladných vlastností snímků, je využit tento algoritmus: V signálu jsou detekovány všechny špičky; signál je v cyklu procházen zleva a je testována hodnota rozdílu dvojic špiček jako $D = A_{poz} - A_{neg}$, kde A_{poz} je hodnota kladné špičky a A_{neg} hodnota negativní špičky. Tento rozdíl D je porovnáván s nastavenou prahovou minimální hodnotou. Obdobný postup nastává při detekci pravého okraje, avšak nyní s obráceným směrem testování od pravého okraje. Přesná pozice (P_p) je pak nalezena průměrem pozic bodů mezi pozicí kladné špičky (P_{poz}) a záporné špičky (P_{neg}) jako $P_p = (P_{poz} - P_{neg})/2$.

Definovaný způsob detekce je výhodný zejména z důvodů stability a přesnosti detekce. Rozdíl dvojice špiček na konci kardiomyocytu je markantní v porovnání s rozdíly dvojic špiček na pozadí a pozici špiček na koncích lze najít s vysokou přesností. Počáteční proces zadání úsečky je možné plně automatizovat, tento postup byl také testován. Postup sestává ze separace objektu kardiomyocytu v prvním snímku od pozadí s využitím postupu uvedeném na Obrázek 9.3. Poté je obrazovým zpracováním nalezena podélná osa kardiomyocytu a protažena o zlomek délky objektu kardiomyocytu. Značné výhody tak může metoda přinést v případě automatizace současného měření kontrakce dvou a více kardiomyocytů, kdy lze obdobným postupem umístit úsečku do podélné osy kardiomyocytů a ty analyzovat současně.



Obrázek 9.13 – Úsek získaného signálu kontrakce detekcí konců v délce zhruba 7 sekund.

Ukázka výsledného signálu získaného kontrakcí kardiomyocytu na Obrázek 9.11 v zobrazení vlevo je uvedena na Obrázek 9.13. Záznam byl pořízen kamerou Andor iXon 860 v rozlišení 128 x 128 px a snímkovací rychlostí 98 fps. Celková délka záznamu je 30 s. Špičky signálu kontrakce jsou negativní, což je dané zmenšením vzdálenosti při kontrakci. Vypočtený maximální rozdíl mezi špičkami (rovný 11 px) vztahený k maximální hodnotě délky kardiomyocytu (82 px) činí 13,4 % délky. Minimální odstup špičky od šumu signálu je 7 px a činí tak 8,5 % maximální délky. Z ukázky a hodnot je patrná vysoká amplituda a signálu s velmi malou hodnotou šumu signálu (bez provedení filtrace či jiných úprav). Nízká úroveň je dána velmi přesnou lokalizací pozice s vysokým rozlišením. Z ukázek je patrné, že metoda je vhodná i pro detekci kamerou s malým rozlišením a v případě současného měření dle schématu na Obrázek 9.7.

K realizaci přestřžení lze využít obecný ostřicí ovládací prvky u mikroskopu. V případě současného měření s využitím optického rozbočovače a dvou kamer to možné není, neboť je nutné na základní úroveň zaostřit objektiv pro získání fluorescenčního snímku. Tedy aby bylo možné realizovat metodu detekce konců se zvýrazněním snímku přestřžením, je nutné jednu optickou cestu přestřžit až po rozdělení optických cest adaptérem. Tento způsob lze zajistit velmi citlivým posuvem kamery. Posuv kamery je umožněn pohyblivým tubusem v přímé cestě k optické kameře, který je do adaptéru zabudován. U tubusu není možné jednoduše realizovat mikroposuv způsobem, jaký je navržen u adaptéru druhého, viz Obrázek 5.14 na str. 59. Úpravou držáku kamery o pojízdné kolejničky a usnadnění posuvu kamery by bylo možné tento prvek snadno do adaptéru doplnit.

9.6 Fluorescenční metoda měření kontrakce

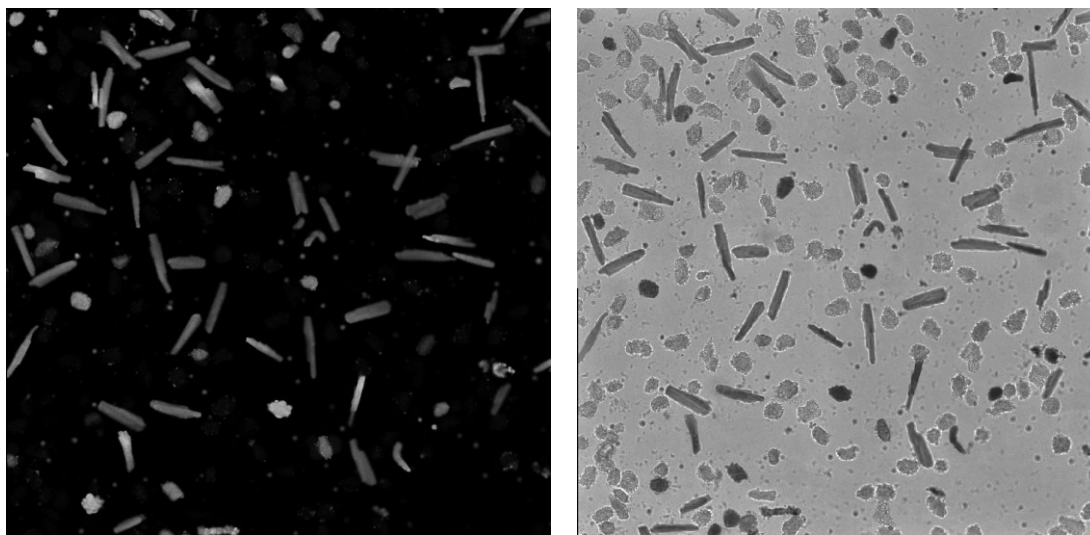
V běžném případě jsou pro měření plochy kontrahujícího se kardiomyocytu či délky jeho kontury používány zdlouhavé a výpočetně náročné algoritmy (Obrázek 9.3 a jeho varianty). Fluorescenční metoda byla vyvinuta za účelem snadné a výpočetně nenáročné detekce plochy, konců nebo kontury kardiomyocytů s vysokou stabilitou detekce. Následující metoda předpokládá velmi dobré využití v systémech pro potřebu nenáročných algoritmů a rychlé hodnocení kontrakce, případně i v režimu měření v reálném čase. Základním předpokladem metody je, že pokud je u kardiomyocytu obarvena membrána anebo cytosol, vykazuje fluorescenční obraz buňky mnohem vyšší kontrast vůči pozadí a výpočetně rychlejší algoritmem lze detekovat konturu buňky ve všech částech obrazu. Kontura buňky vykazuje také vyšší spojitost než v případě zobrazení a detekce ve světlém poli. Ve výsledku také dochází ke zjednodušení algoritmů pro měření plochy kardiomyocytu, neboť fluorescenční obraz vytváří homogenní plochu v oblasti kardiomyocytu, na rozdíl od obrazu ve světlém poli, kde jsou patrné velmi časté přechody kontrastu zejména v podélné ose kardiomyocytu.

K obarvení buněk byl použit Calcein. Calcein je běžně využíván pro hodnocení viability buněk. Calcein proniká za běžných inkubačních podmínek při teplotě 37 °C do cytosolu a jádra, za nízkých inkubačních teplot v cytosolu a mitochondriích [145]. Samotná fluorescence a její míra jsou podmíněny viabilitou kardiomyocytu. Viabilní, funkční kardiomyocyty v tomto případě vyzařují silnou fluorescenci v zelené části spektra. Úroveň fluorescence také závisí na koncentraci Calceinu. Calcein se ukázal jako vhodný pro využití ve fluorescenční metodě měření kontrakce buněk z více důvodů. Jak již bylo zmíněno, zřejmou výhodou je jeho prostorové rozložení do celého cytosolu a některých organel, a tak vyzařuje fluorescenci v prostoru celé buňky, s minimální úrovní fotovysvěcování. Dále je to velmi podstatný obecně známý fakt, že Calcein neovlivňuje procesy v elektrofyziologii u sledovaných buněk, anebo je ovlivňuje jen v zanedbatelné míře. Na tento fakt poukazuje i publikace [143], kde byly s využitím Calceinu kardiomyocyty dlouhodobě sledovány.

Samotná podstata využití fluorescenční barvy pro zvýšení kontrastu kardiomyocytu k pozadí je založena na možnosti realizace prostého prahování, kdy oblast v obraze zahrnující kardiomyocyt

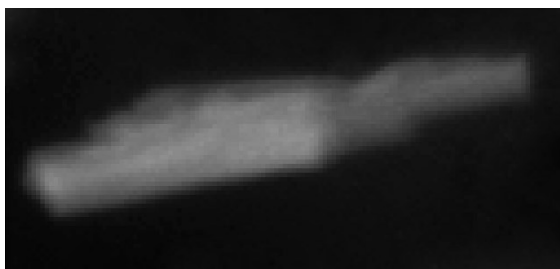
obsahuje nadprahové hodnoty pixelů. Práh je vhodné volit s ohledem na míru fluorescence a s tím související hodnotu pixelů v okrajových oblastech. V centrální oblasti buňky může být docházet k saturaci, to však nijak neovlivňuje funkci algoritmu. Naopak, pokud v se ve vnitřním úseku kardiomyocytu nachází úseky s žádnou anebo nedostatečnou fluorescence, je možné vzniklá prázdná místa v nalezeném objektu vyplnit s využitím morfologických funkcí. Je nutné poznamenat, že Calcein vykazuje fluorescenci také v extracelulárním prostředí, která je mnohonásobně nižší (100-200 000 nižší než v intracelulárním prostředí), avšak může mít v případě přílišné koncentrace Calceinu na krok segmentace vliv. Z tohoto důvodu je vhodné volit vhodnou (standardní, doporučovanou) koncentraci Calceinu a také nastavit u snímáče vhodný expoziční čas pro eliminaci pozadí.

Fluorescenční snímek pořízený konfokálním fluorescenčním mikroskopem Leica TCS SP8X se zvětšením 10X je zobrazen na Obrázek 9.14, současně s odpovídajícím snímkem ve světlém poli. Kardiomyocyty byly nabarveny Calceinem s výslednou koncentrací 4 μM , médiem je Tyrodův roztok. Inkubace probíhala 30 min v inkubátoru za teploty 37°C. Kardiomyocyty podélného tvaru s dobrou viabilitou vykazují jasnou fluorescenci. Calcein je aktivní také v některých mrtvých buňkách. Snímek ve světlém poli naopak obsahuje všechny živé i mrtvé kardiomyocyty a jakékoli částice přítomné v médiu anebo na misce. U některých kardiomyocytů je patrné silně nerovnoměrné rozložení fluorescence anebo se v obraze přímo ztrácí jejich část. Je to způsobeno prostorovým natočením těchto kardiomyocytů a velmi úzkou konfokální rovinou při snímání.



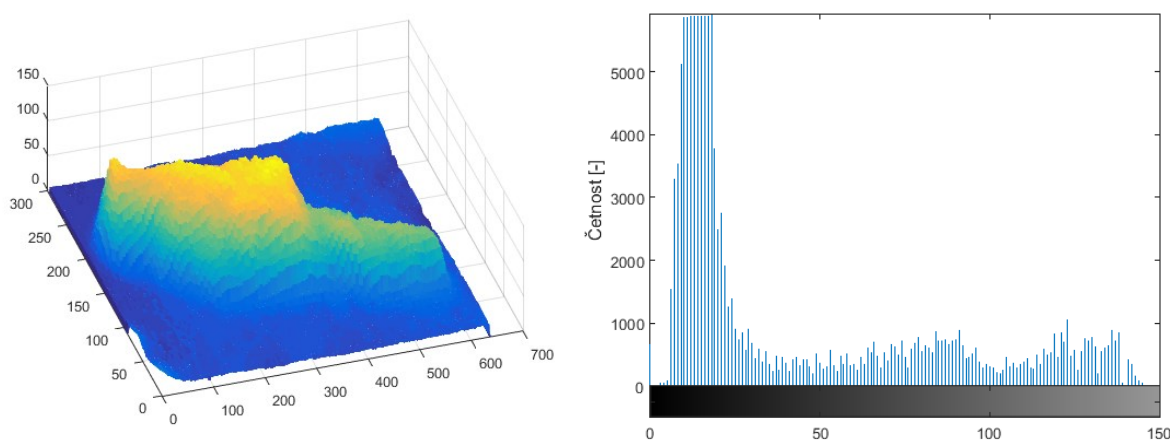
Obrázek 9.14 – Mikroskopický snímek se skupinou kardiomyocytů. Vlevo fluorescenční snímek s buňkami obarvenými Calceinem, vpravo zobrazení ve světlém poli.

Naproti tomu je u standardního invertovaného epi-fluorescenčního mikroskopu možné, výhodněji, zabrat velkou optickou rovinu a získat signál z velké části objemu kardiomyocytu. Příklad snímku pořízeného na fluorescenčním mikroskopu Olympus IX-71 s obdobným zvětšením jako v předešlém případě je uveden na Obrázek 9.15.



Obrázek 9.15 – Kardiomyocyt umístěný v Tyrodově roztoku obarvený Calceinem o výsledné koncentraci 4 μM .

Na vygenerovaném 3D modelu s využitím pseudobarevného zobrazení v závislosti na úrovni hodnoty pixelů nebo z následující histogramu (Obrázek 9.16) je patrný dostatečný odstup hodnot pixelů v obraze buňky od hodnot pixelů pozadí. Tento rozdíl lze s využitím obrazového zpracování ještě zvýraznit. Na základě uvedeného histogramu lze snadno stanovit vhodný práh pro segmentaci obrazu.



Obrázek 9.16 – Výškový profil fluorescenčního snímku (vlevo) vygenerovaný z šedotónového snímku (Obrázek 9.15). Horizontální osy znázorňují velikost v pixelech, vertikální osa znázorňuje hodnotu pixelů. Vpravo je uveden histogram shodného snímku.

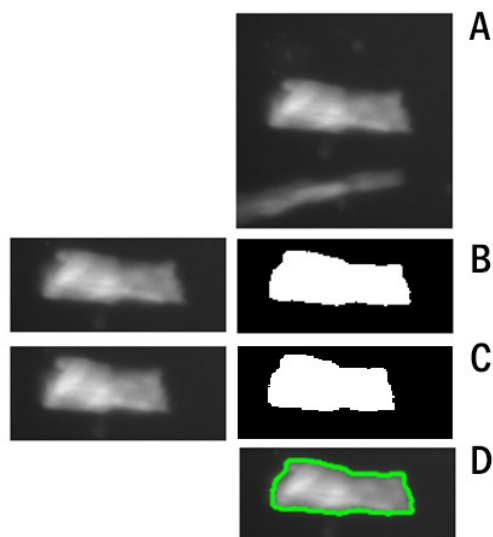
9.6.1 Hodnocení tvarových parametrů při kontrakci

Při kontrakci lze pozorovat celkem tři změny velikosti a tvaru, ze kterých je možné detekovat úroveň probíhající kontrakce. Kardiomyocyt se stahuje v podélné ose, tím se k sobě přibližují vzdálené konce a dochází ke změně velikosti buňky. Zároveň dochází k roztažení jeho podélných stran v kolmém směru na osu kardiomyocytu. V některých případech tak může dojít k prohýbání během kontrakce. S využitím fluorescenční metody byla provedena analýza těchto tvarových parametrů.

Pro analýzu byl použit 64s záznam kontrakce kardiomyocytu obarveného barvivem Calcein o výsledné koncentraci 4 μM v médiu (Tyrodův roztok). Sekvence obrazů byla pořízena kamerou Andor iXon 860 na mikroskopu Olympus iX-71 v rozlišení 128x128 px se snímkovací rychlostí 50 fps. Záznam probíhal 30s inkubaci a propláchnutí média s řízenou stimulací. Stimulace byla prováděna s frekvencí 1,5 Hz, s níž lze výsledky porovnat. Signál obsahuje arytmiie – v pěti případech je patrná absence kontraktálního cyklu (resp. nastává vynechání špiček v signálu), takže se v něm vyskytují celkem dvě frekvence špiček. To je patrné z vygenerovaných histogramů (Obrázek 9.23).

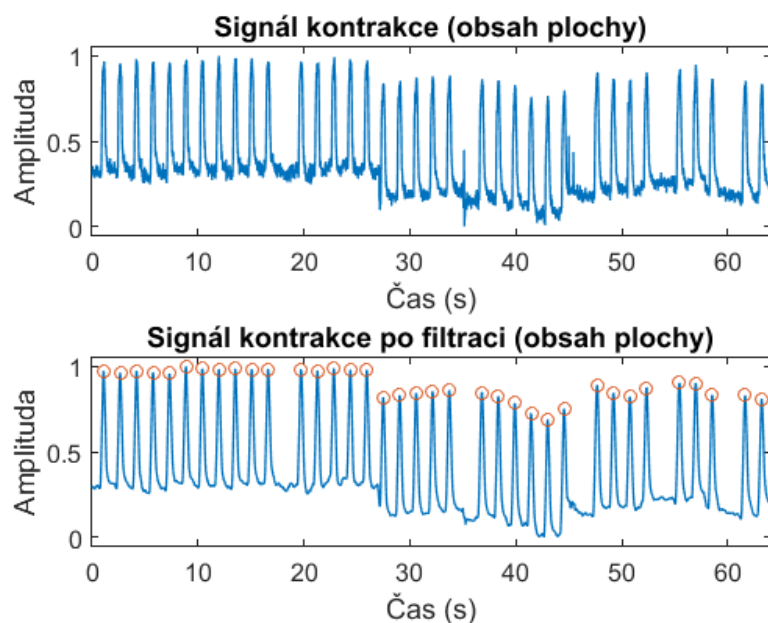
Obraz hodnoceného kardiomyocytu v celém zorném poli spolu s nežádoucími objekty je zobrazen na Obrázek 9.17 (A). Výběrem oblasti zájmu došlo k odstranění ostatních objektů, které mohou činit vliv na měřenou kontrakci sledovaného kardiomyocytu. Celý výpočetní algoritmus sestává

z oddělení obrazu buňky od pozadí segmentací na základě prostého prahování a následného získání tvarových parametrů měřeného objektu – délky kontury objektu, vzdálenosti konců, velikosti plochy objektu nebo jeho kulatosti. Změny těchto parametrů v závislosti na kontrakci kardiomyocytu jsou v následující části podrobeny analýze. Soupis všech hodnocených tvarových parametrů je uveden v Tabulka 9.1 včetně získaných výsledků. Příklad segmentovaných obrazů v maximální kontrakci (C) a v klidovém stavu (B) jsou zobrazeny na obrázku Obrázek 9.17 spolu s ukázkou nalezené kontury (D).

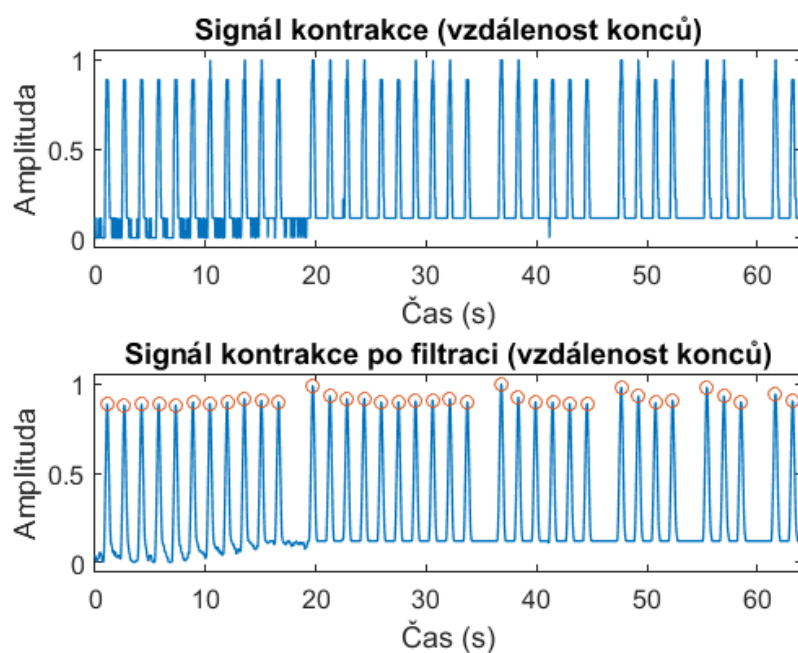


Obrázek 9.17 – A – originální obrázek pořízený kamerou Andor iXon 860 v rozlišení 128x128 px. B – výřez snímku bez nežádoucích objektů na pozadí určený pro analýzu – v případě relaxace, C – v případě kontrakce. D – nalezená kontura kardiomyocytu.

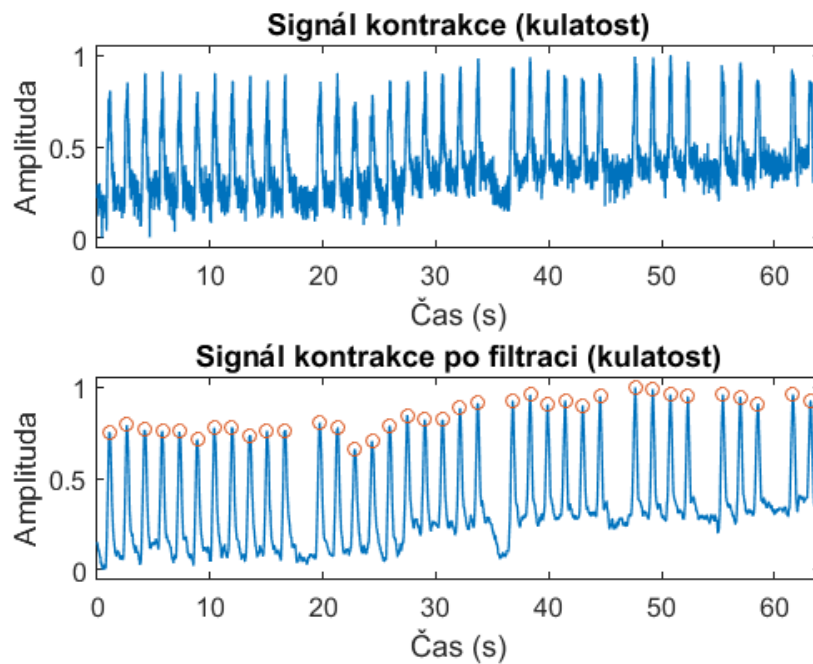
Jednotlivé tvarové parametry se od sebe liší svým charakterem. Zatímco délka kontury anebo obsah plochy odpovídají celkové změně tvaru buňky, podobně jako jeho kulatost, vzdálenost konců a aproximující elipsa jsou naopak méně nebo vůbec nejsou citlivé na lokální změny při změně tvaru buňky. Ze změn tvarových parametrů v čase byly získány signály prezentované na Obrázek 9.18 až Obrázek 9.22. Signály byly podrobené filtraci s využitím Savitzky–Golay filtru za účelem jejich vyhlazení a následně byly detekovány špičky. Z těchto nalezených bodů byly vypočteny periody a následně frekvence vzdáleností špiček, jejichž průměrná hodnota, medián a nejčastější hodnota jsou uvedeny v Tabulka 9.1.



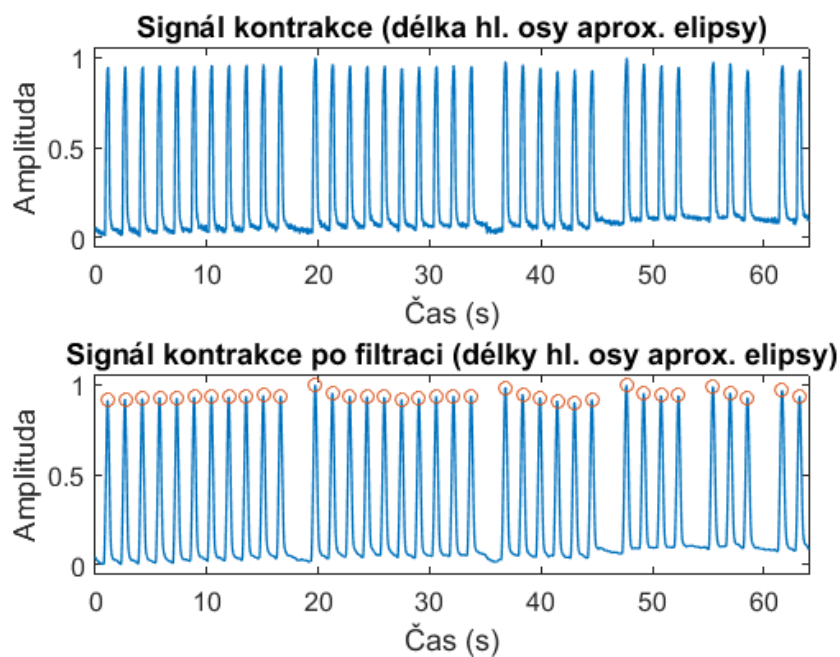
Obrázek 9.18 – Signál kontrakce získaný ze změny obsahu plochy, 64s záznam (nahore). Signál po filtraci a s vyznačením nalezených špiček.



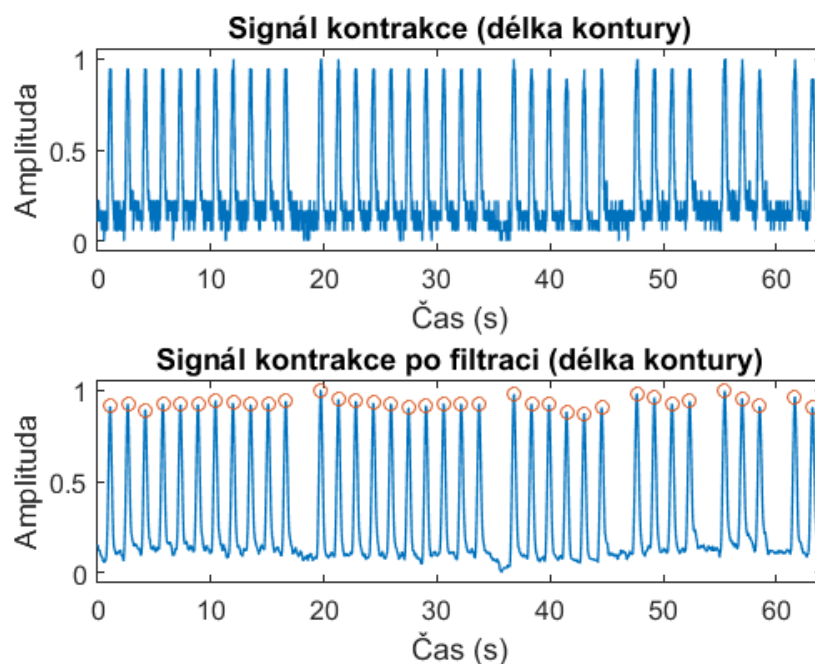
Obrázek 9.19 – Signál kontrakce získaný ze změny vzdálenosti konců, 64s záznam (nahore). Signál po filtraci a s vyznačením nalezených špiček.



Obrázek 9.20 – Signál kontrakce získaný ze změny kulatosti objektu, 64s záznam (nahore). Signál po filtraci a s vyznačením nalezených špiček.



Obrázek 9.21 – Signál kontrakce získaný z délky hlavní osy aproximující elipsy, 64s záznam (nahore). Signál po filtraci a s vyznačením nalezených špiček.



Obrázek 9.22 – Signál kontrakce získaný ze změny nalezené kontury, 64s záznam (nahore). Signál po filtraci a s vyznačením nalezených špiček.

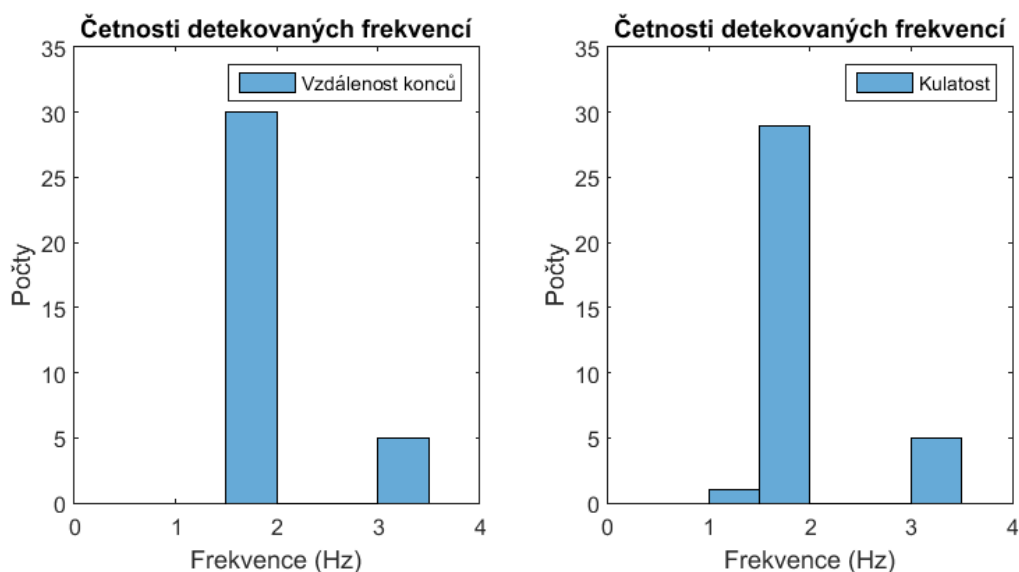
Kulatost objektu byla vypočtena s využitím obvodu a plochy dle vztahu:

$(\text{obvod}^2) / (4 * \pi * \text{plocha})$; Zatímco délka hlavní osy aproximující elipsy byla získána s využitím funkce `regionprops` jako `MajorAxisLength`.

Tabulka 9.1 – Přehled hodnocených tvarových parametrů a dosažených výsledků změn parametrů při kontrakci

Název měřeného parametru	Změna parametru (%)	Medián frekvencí [Hz]		Průměrná hodnota frekvencí [Hz]		Nejčastější hodnota frekv. [Hz]	
		Bez filtr.	S filtr.	Bez filtr.	S filtr.	Bez filtr.	S filtr.
Vzdálenost konců	10,98	1,56	1,56	1,7749	1,7743	1,54	1,54
Plocha	7,41	1,54	1,56	1,7749	1,7731	1,54	1,50
Délka kontury	8,86	1,56	1,56	1,7737	1,7731	1,54	1,54
Kulatost	17,63	1,56	1,56	1,7737	1,7714	1,58	1,58
Délka hlavní osy (elipsy)	11,34	1,56	1,56	1,7743	1,7737	1,54	1,54

V délce 64s signálu bylo pro každý parametrů detekováno celkem 36 špiček, ze kterých vychází výpočty frekvence (celkem 35 frekvencí). Příklad detekovaných frekvencí pro dva odlišné typy tvarových parametrů vyjadřuje dvojice histogramů na Obrázek 9.23. Z histogramů a tabulky je patrné, že odchylky pro jednotlivé parametry jsou minimální. Příklad srovnáním k frekvenci 1,5 Hz u stimulačního zdroje pro stimulaci kardiomyocytu vzniká rozdíl 0,04-0,08 Hz (nejčast. hodnota), avšak sám stimulační systém může vykazovat odchylku v tomto intervalu – posun daný např. časovým zpožděním od nastavené frekvence.

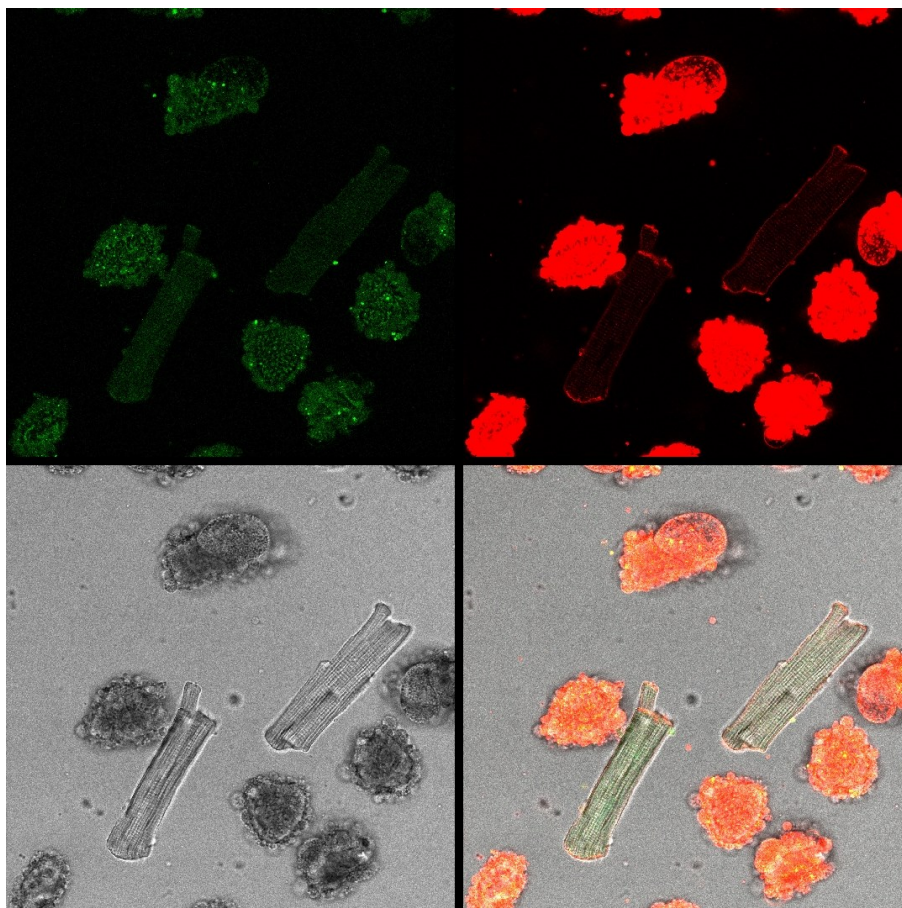


Obrázek 9.23 – Histogram vypočtených frekvencí špiček pro vzdálenost konců a pro kulatost měřeného objektu.

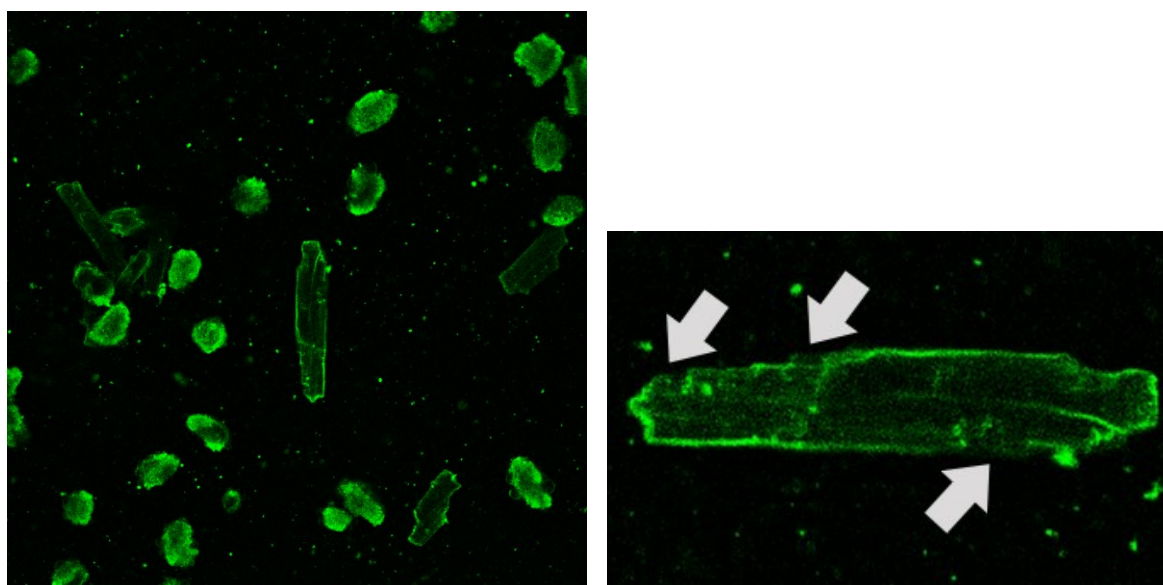
9.6.2 Barvení kardiomyocytů

Calcein není jedinou variantou při obarvení kardiomyocytu. Další možnost nabízí napětově citlivá barviva (VSD), která se velmi dobře zachytávají v sarkolemě – ve fosfolipidové dvojvrstvě a ve výsledku je lze využít ke značení sarkolemy. Obdobně působí lipofilní značící barva DiO (Vybrant DiO, Thermo Fisher Scientific). VSD poskytují alternativu k membránovým značkám. Jsou to fluoreskující struktury s dlouhým řetězcem, které se zaklíní do membrány buňky, kde rovněž vykazují silnou fluorescenci oproti vodnému okolnímu prostředí. Přestože se Di-4-ANEPPS velmi dobře váže na membránu buňky, vykazuje ve srovnání s DiO menší fluorescenci a vyšší toxicitu.

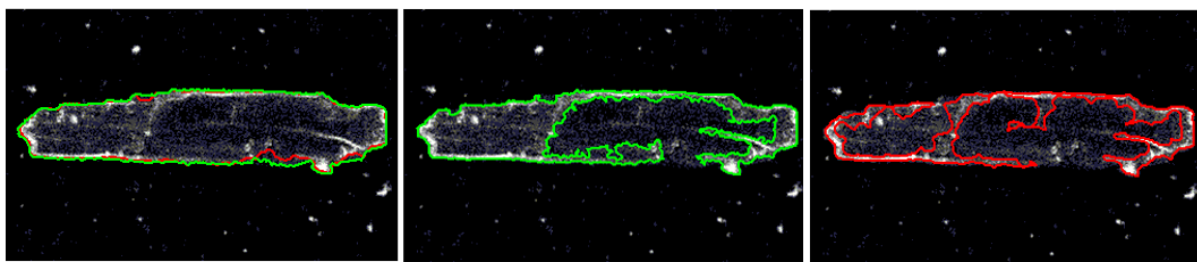
Následující mikroskopický snímek ukazuje celkem tři kanály, jeden ve světlém poli a dva fluorescenční s použitím barviva Di-4-ANEPPS a s použitím barviva Calcein (Tyrodův roztok, výsledná koncentrace Calceinu je $2\text{ }\mu\text{M}$, u Di-4-ANEPPS je dvojnásobná – $4\text{ }\mu\text{M}$). Membrána buňky v řezu buňkou tvoří souvislou nebo částečnou souvislou tenkou obvodovou linku jako hranici buňky. Ze snímků je znatelné, že se barvivo váže na rozsáhlejší struktury – zakončení, které pak ve výsledku tvoří oblasti s větším kontrastem oproti běžným úsekům membrány. Výsledkem může být různí se úrovně spojitosti hranice buňky ve fluorescenčním obraze. Calcein je v buňce přítomen volně v cytoplazmě bez výrazných vazeb na vnitřní struktury. V obraze se tedy neprojevuje relativně homogenně v prostoru celé buňky, nevyznačuje výrazné lokální extrémy. Za obdobných podmínek byl pořízen snímek s kardiomyocyty obarvenými fluorescenční značkou DiO Obrázek 9.25. Příklad vlivu chybného značení membrány na detekci kontury kardiomyocytu s využitím algoritmu z Obrázek 9.3 (str. 124) je uveden na Obrázek 9.26. Levý snímek ukazuje nalezenou konturu v případě ručního, velmi přesného nastavení. Prostřední a pravý snímek zobrazují časté případy chybné detekce vzhledem ke vzniklým nespojitostem značení sarkolemy.



Obrázek 9.24 – Mikroskopický snímek v rozlišení 1800x1800 px pořízený na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8X. Jedná se o současné zobrazení živých a mrtvých kardiomyocytů obarvených barvivy Di-4-ANEPPS a Calcein spolu se zobrazením morfologie buněk ve světlém poli.



Obrázek 9.25 – Mikroskopický snímek pořízený na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8X se značením sarkolemy fluorescenční značkou DiO. Vlevo celý snímek, vpravo výřez (980x980 px). Šipky ukazují na dvě části sarkolemy, která je velmi slabě značena (vykazuje velmi malou fluorescenci) a na nespojitý, relativně dlouhý, úsek sarkolemy.



Obrázek 9.26 – Příklad detekce kontury kardiomyocytu s využitím algoritmu (Obrázek 9.3, str. 124). Levý snímek ukazuje nalezenou konturu v případě ručního, velmi přesného nastavení. Červená barva značí konturu získanou při použití segmentace na základě hranové detekce, zelená při použití segmentace při použití segmentace s prostým prahováním. Prostřední a pravý snímek zobrazují časté případy chybné detekce vzhledem ke vzniklým nespojitostem značení sarkolemy.

9.7 Diskuse

V kapitole byl na začátku představen obecný algoritmus detekce hranice sarkolemy kardiomyocytu vedoucí k odstranění pozadí a oddělení objektu kardiomyocytu od pozadí pro jeho další analýzu, z něhož vychází řada publikovaných algoritmů a metod zaměřených na hodnocení signálů kontrakce z celých kardiomyocytů. Ostatní publikované metody se zaměřují na detekci změn v interních strukturách – v proužkování. Ve zbylé části byly realizovány dva odlišné algoritmy, které jsou zaměřeny na zvýšení spolehlivosti detekce pro využití v náročnějších podmínkách – zejména v případě využití metod v současném měření kontrakce kardiomyocytů spolu s fluorescenčním měřením vápníkových transientů. Náročnější podmínky v těchto případech znamenají snížení intenzity jasu průchozího světla a související snížení kontrastu ve snímku anebo zvýšení úrovně šumu ve snímku. Metoda detekce využívá výhod úpravy mikroskopických snímků přeostrněním od základní optické roviny ostrosti, jejímž důsledkem je výrazné zvýšení kontrastu v přechodu mezi měřeným objektem (volným kardiomyocytům) a pozadím v blízkém okolí kardiomyocytu. Metoda využívá úsečky vedené podélně kardiomyocytům v jeho středu, ze které je z hodnot pixelů na jednotlivých pozicích sestaven signál. V signálu lze detekovat dvojici špiček – vždy pozitivní a negativní špičky následující po sobě. Algoritmem založeným na detekci těchto dvojic lze spolehlivě a přesně získat pozice konců kardiomyocytu v obraze - ve srovnání s běžnou metodou zaostření kardiomyocytu a detekcí pouze jedné úrovně špiček signálu odpovídajícím koncům buňky. Odstup hledaných bodů od pozadí (včetně pixelů v kardiomyocytu) byl zjištěn přibližně o 40-80 % větší ve srovnání s běžnou metodou.

Druhá metoda vyžaduje techniky fluorescenční mikroskopie a vhodnou fluorescenční značku, která značí buď cytosol nebo sarkolemu kardiomyocytu. Výsledkem je obraz buňky, který je mnohem více kontrastní vůči pozadí, než obraz zobrazený ve světlém poli. Fluorescenční metoda byla testována v experimentu s využitím externího stimulátoru pro aktivaci funkce kardiomyocytů s řízenou frekvencí stimulačních impulsů. Této frekvenci se frekvence kontrakčních cyklů kardiomyocytů přizpůsobuje. Pro tento účel byl zvolen takový záznam, kde kontrakce vykazuje arytmie, konkrétně jsou v 64s záznamu vynechány špičky na 5 pozicích. Obrazovým zpracováním fluorescenčních snímků z video-sekvence byly odlišnými postupy extrahovány signály kontrakce. Tyto signály byly získány z tvarových parametrů - obsahu plochy, ze vzdálenosti konců, z kulatosti objektu a délky hlavní osy elipsy. Přesněji z jejich změn. U signálu byly detekovány špičky a hodnoty porovnány. V hodnocení bylo zjištěno, že všemi postupy lze po filtraci signálu a shodném postupu v detekci získat hodnoty se stejnou úrovní přesnosti, s odlišností max. ve 3 desetínách procenta. U hodnocené změny parametru (v procentech), které udává rozlišení v amplitudě signálu, vykazuje nejlepší výsledky hodnocení kulatosti, v dalších případech vzdálenost hlavní osy aproximační elipsy anebo vzdálenosti konců. Z vizualizací signálů je však patrné,

že signály získané z kulatosti nebo obsahu plochy měřeného objektu vykazuje občasné lokální výkyvy v signálu, v klidovém stavu buňky (mezi špičkami) a u těchto signálů se také mění úroveň izolinie. Tyto vlastnosti mohou způsobit chybu v detekci v případě primitivních postupů (např. stanovení prostého prahu, absence filtrace), zvýšení kvality těchto signálů mohou zajistit přídatné kroky v algoritmu (vyrovnání izolinie před detekcí).

Diskutabilní je hodnocení úspěšnosti uvedených metod, zejména zvýšení stability či přesnosti při detekci. V případě volných izolovaných kardiomyocytů bylo obtížné zajistit k porovnání referenční zdroj (obrazů, signálů). Proto byly vlastnosti metod vystiženy a uvedeny na zřetelných příkladech a ukázkách. Obdobně je tomu často u dosud publikovaných metod, kde autoři prezentují výsledky představených metod na vlastních datech – s ukázkou výstupů (výstupních signálů s popisem jejich charakteru, ukázkou detekce).

10 Závěr

Disertační práce se zaměřovala na aplikaci optických metod měření s využitím technik optické mikroskopie a fluorescenční mikroskopie pro měření elektromechanických projevů izolovaných srdečních buněk a shluků diferencovaných kardiomyocytů. V práci byla provedena rešerše zahrnující využití optických metod s rozбором jejich variant pro měření kontrakce srdečních buněk a vápníkových transientů. Další část práce se zabývala dvěma typy kardiomyocytů, na kterých jsou optické metody měření ověřovány, dále procesy vazby excitace-kontrakce a signály z nich vystupujících, které byly stěžejní pro analýzu v praktické části práce. Teoretický základ práce byl doplněn rozбором techniky světelné a fluorescenční mikroskopie a perspektivních variant, důležitou součástí pak byla část vícekanálového měření, které umožňuje realizaci měření více fyziologických parametrů buněk současně. Kapitoly tvoří dostatečný teoretický podklad práce pro realizaci metod měření a jejich ověření v praktické části.

V praktické části je představena realizace a ověření několika metod optického měření elektromechanických projevů jednotlivých kardiomyocytů a shluků kardiomyocytů. Výsledky jsou u každé z kapitol shrnuty v diskusích - rozboru výsledků - na konci jednotlivých kapitol.

První navržená metoda využívá účelné kombinace fluorescenční mikroskopie s vybavením rychlou fluorescenční kamerou s vysokým rozlišením a mikroskopie atomárních sil pro současné měření vápníkových transientů a kontrakce shluků srdečních buněk. Získané signály prošly procesem filtrace třemi odlišnými typy filtrací - lineární filtrací, filtrací EEMD a filtrací mediánovým filtrem. Filtrace byly navzájem porovnány. K porovnání byly zvoleny dva přístupy - z hlediska účinnosti filtrace a z hlediska vlivu na výslednou kvalitu signálu pro přesnost detekce stěžejních bodů důležitých pro následné rozměření. Ze skupiny hodnocení byla jako nejúčelnější vybrána filtrační metoda EEMD. V další fázi byly porovnány skupiny funkčních parametrů získaných z tzv. kontrolního signálu a signálu pořízeného po aplikaci kofeinu. Z výsledků vyplynul vliv testované látky na několik funkčních parametrů. V první řadě se změnila průměrná frekvence ve spektru frekvencí detekovaných špiček a na podobné úrovni nastaly změny u průměrné hodnoty maximálních hodnot detekovaných špiček. Změny se projevíly současně u signálů kontrakce a u signálů vápníkových transientů. U prvního hodnoceného parametru nastal ve frekvencích pokles zhruba o 10 % a u detekovaných maxim špiček o zhruba 25 %. Změny se projevíly také ve funkčních parametrech. U signálu kontrakcí došlo ke zdatelné protažení kontrakční i relaxační fáze a mírného zvětšení šířky špiček v jejich polovině. U signálů vápníkových transientů se největší změny projevíly v relaxační fázi, kde nastalo její protažení. V praktické části byla úspěšně ověřena realizace optické metody současného měření vápníkových transientů a kontrakce shluků srdečních buněk, kde byly po provedených procesech signálového zpracování a analýzy prokázány změny v hodnocených parametrech.

Druhá navržená metoda byla aplikována u shluků kardiomyocytů za účelem ověření optické metody měření kontrakce. Signály získané optickou metodou byly analyzovány a výsledky porovnány s analyzovaným referenčním signálem získaným měřením s pomocí mikroskopie atomárních sil. Testovány byly celkem dvě metody s odlišnými přístupy - metoda založená na sledování časových změn v pohybu hranice měřeného objektu a metoda založená na sledování časových změn interních struktur měřeného objektu. U obou signálů byly detekovány signálové špičky a z jejich vzdáleností (u dvojic špiček) a maximálních hodnot získaných u špiček byly sestaveny spektra frekvencí špiček a spektra maximálních hodnot. U těchto parametrů byly hodnoceny vzájemné rozdíly průměrných hodnot a rozdíly mezi jednotlivými detekovanými hodnotami. V kapitole byla ověřena optická metoda měření kontrakce. Oba postupy se ukázaly jako velmi přesné. Odlišnost v přesnosti metody optické a AFM nastávala jen v případech změny okolních podmínek (různorodost měřených objektů, změna oblasti

zájmu). Součástí kapitoly je rozbor těchto podmínek, za kterých se optická metoda měření kontrakce přibližuje svou přesností referenční metodě.

Ve třetí kapitole byla ověřována metoda optického měření kontrakce izolovaných srdečních buněk spolu s možností současného měření s rovněž optickým měřením vápníkových transientů, kombinací optické mikroskopie ve světlem poli a fluorescenční mikroskopie. Metody měření kontrakce představené v kapitole se zaměřovaly na zvýšení úrovně spolehlivosti a stability detekce konců buňky anebo její kontury. Metody byly testovány pro využití v náročnějších podmínkách – zejména v případě využití metod v současném měření kontrakce kardiomyocytů spolu s fluorescenčním měřením vápníkových transientů. Náročnější podmínky v těchto případech znamenají snížení intenzity jasu průchozího světla a související snížení kontrastu ve snímku anebo zvýšení úrovně šumu ve snímku. Zatímco metoda detekce konců vyžádala zvýšení detekční schopnosti výhodným zvýšením kontrastu obrazu přeostrněním od základní optické roviny zaostření a následné možnosti výhodné lokalizace bodů konců buňky v signálu, fluorescenční metoda byla založená na využití technik fluorescenční mikroskopie a barvení cytosolu anebo sarkolemy fluorescenční značkou s výhodami zvýšení kontrastu obrazu měřeného objektu vůči pozadí. Funkce fluorescenční metody a vhodné varianty extrakce signálu kontrakce z tvarových parametrů u této metody byly ověřovány na videosekvenci kontrahující se buňky. Extrahované signály na základě časových změn jednotlivých tvarových parametrů byly porovnány a hodnoceny jejich vlastnosti. U metod byly vystiženy výhodné vlastnosti, které byly patrné z předvedených zřetelných ukázek. Hodnocení úspěšnosti uvedených metod, zejména úroveň zvýšení stability či přesnosti při detekci, byla obtížná vzhledem k absenci referenčních zdrojů dat.

Souhrnně lze říci, že optické metody prezentované v práci prokázaly předpokládané možnosti a perspektivní vlastnosti a ve výsledcích bylo prokázáno jejich praktické použití a v mnoha případech dosažení vysoké přesnosti v případě porovnání s referenčními hodnotami.

11 Seznam literatury

- [1] SONG, Guojie, Sian E HARDING, Michael R DUCHEN, Richard TUNWELL, Peter O GARA, T I M E HAWKINS a Stephen E MOSS. Altered mechanical properties and intracellular calcium signaling in cardiomyocytes from annexin 6 null-mutant mice 1 [online]. nedatováno, s. 622–624. Dostupné z: doi:10.1096/fj.01
- [2] MØRK, Halvor K, Ivar SJAASTAD, Ole M SEJERSTED a William E LOUCH. Slowing of cardiomyocyte Ca²⁺ release and contraction during heart failure progression in postinfarction mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* [online]. 2009, roč. 296, č. 4, s. H1069–H1079 [vid. 2012-12-03]. ISSN 0363-6135. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.01009.2008
- [3] PEREIRA, Laetitia, Jan MATTHES, Iris SCHUSTER, H VALDIVIA, Stefan HERZIG a Sylvain RICHARD. Mechanisms of [Ca²⁺]_i Transient Decrease in Cardiomyopathy of db / db Type 2 Diabetic Mice. 2006, roč. 55, č. March.
- [4] YU, Zhen. Intracellular Calcium Mobilization in Cardiomyocytes of Rats With Experimental Diabetes. 1993, č. July.
- [5] HAGEN, Brian M., Liron BOYMAN, Joseph P Y KAO a W. Jonathan LEDERER. A comparative assessment of fluo Ca²⁺ indicators in rat ventricular myocytes. *Cell Calcium* [online]. 2012, roč. 52, č. 2, s. 170–181. ISSN 01434160. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceca.2012.05.010
- [6] TAKAHASHI, a, P CAMACHO, J D LECHLEITER a B HERMAN. Measurement of intracellular calcium. *Physiological reviews* [online]. 1999, roč. 79, č. 4, s. 1089–125. ISSN 0031-9333. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508230>
- [7] LOUCH, William E, Katherine A SHEEHAN a Beata M WOLSKA. NIH Public Access. *J Mol Cell Cardiol.* [online]. 2011, roč. 51, č. 3, s. 288–298. ISSN 00222828. Dostupné z: doi:10.1016/j.yjmcc.2011.06.012. Methods
- [8] KNISLEY, S.B. Mapping intracellular calcium in rabbit hearts with fluo 3. *Proceedings of 17th International Conference of the Engineering in Medicine and Biology Society* [online]. 1995, roč. 1, s. 65–66. Dostupné z: doi:10.1109/IEMBS.1995.575002
- [9] WATANABE, a a M ENDOH. Relationship between the increase in Ca²⁺ transient and contractile force induced by angiotensin II in aequorin-loaded rabbit ventricular myocardium. *Cardiovascular research* [online]. 1998, roč. 37, č. 2, s. 524–31. ISSN 0008-6363. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9614506>
- [10] ŠVRČEK, Ing Martin. Faculty of Electrical Engineering and Communication NEW APPROACHES IN CARDIAC OPTICAL MAPPING. 2010.
- [11] BLASDEL, Gary G. a Guy SALAMA. Voltage-sensitive dyes reveal a modular organization in monkey striate cortex. *Nature* [online]. 1986, roč. 321, č. 6070, s. 579–585. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/321579a0
- [12] EHLER, Elisabeth, Thomas MOORE-MORRIS a Stephan LANGE. Isolation and culture of neonatal mouse cardiomyocytes. *Journal of visualized experiments: JoVE* [online]. 2013, roč. 15, č. 79, s. e50154. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/50154
- [13] THUM, T. a J. BORLAK. Isolation and cultivation of Ca²⁺ tolerant cardiomyocytes from the adult rat: improvements and applications. *Xenobiotica* [online]. 2000, roč. 30, č. 11, s. 1063–1077. ISSN 0049-8254. Dostupné z: doi:10.1080/00498250010005196
- [14] CONNELL, Timothy D O, Yan G NI, Keng-mean LIN, Heping HAN a Zhen YAN. Isolation and Culture of Adult Mouse Cardiac Myocytes for Signaling Studies. 2003, roč. 1, č. 5, s. 1–9.
- [15] MITCHESON, J S, J C HANCOX a a J LEVI. Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties [In Process Citation]. *Cardiovasc.Res.* [online]. 1998, roč. 39, č. 2, s. 280–300. ISSN 0008-6363. Dostupné z: doi:10.1016/S0008-6363(98)00128-X
- [16] CHLOPČIKOVA, Sarka, Jitka PSOTOVA a Petra MIKETOVA. Neonatal rat cardiomyocytes - a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomedical Papers* [online]. 2001, roč. 145, č. 2, s. 49–55. ISSN 12138118. Dostupné z: doi:10.5507/bp.2001.011
- [17] HOLT, E., P. K. LUNDE, O. M. SEJERSTED a G. CHRISTENSEN. Electrical stimulation of adult rat cardiomyocytes in culture improves contractile properties and is associated with altered calcium handling. *Basic Research in Cardiology* [online]. 1997, roč. 92, č. 5, s. 289–298. ISSN 0300-8428. Dostupné z: doi:10.1007/BF00788941
- [18] RAJAMOCHAN, Divya, Elena MATSA, Spandan KALRA, James CRUTCHLEY, Asha PATEL, Vinoj GEORGE a

- Chris DENNING. Current status of drug screening and disease modelling in human pluripotent stem cells. *BioEssays* [online]. 2013, roč. 35, č. 3, s. 281–298. ISSN 02659247. Dostupné z: doi:10.1002/bies.201200053
- [19] TANAKA, Atsushi, Shinsuke YUASA, Koichi NODE a Keiichi FUKUDA. Cardiovascular disease modeling using patient-specific induced pluripotent stem cells. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2015, roč. 16, č. 8, s. 18894–18922. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms160818894
- [20] RAAB, Stefanie, Moritz KLINGENSTEIN, Stefan LIEBAU a Leonhard LINTA. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem Cells International* [online]. 2014, roč. 2014, s. 1–12. ISSN 1687-966X. Dostupné z: doi:10.1155/2014/768391
- [21] PESL, Martin, Jan PRIBYL, Ivana ACIMOVIC, Alexandra VILOTIC, Sarka JELINKOVA, Anton SALYKIN, Alain LACAMPAGNE, Petr DVORAK, Albano C. MELI, Petr SKLADAL a Vladimír ROTREKL. Atomic force microscopy combined with human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes for biomechanical sensing. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2016, roč. 85, s. 751–757. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2016.05.073
- [22] GHERGHICEANU, Mihaela, Lili BARAD, Atara NOVAK, Irina REITER, Joseph ITSKOVITZ-ELDOR, Ofer BINAH a L.M. POPESCU. Cardiomyocytes derived from human embryonic and induced pluripotent stem cells: comparative ultrastructure. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. 2011, roč. 15, č. 11, s. 2539–2551. ISSN 15821838. Dostupné z: doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01417.x
- [23] SCHLÜTER, Klaus-Dieter. Cardiomyocytes – Active Players in Cardiac Disease. nedatováno.
- [24] KONDO, Richard P., Dorothy A. DEDERKO, Christine TEUTSCH, Jacqueline CHRAST, Daniele CATALUCCI, Kenneth R. CHIEN a Wayne R. GILES. Comparison of contraction and calcium handling between right and left ventricular myocytes from adult mouse heart: a role for repolarization waveform. *The Journal of Physiology* [online]. 2006, roč. 571, č. 1, s. 131–146. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.2005.101428
- [25] SEVERS, Nicholas J. The cardiac muscle cell. *BioEssays* [online]. 2000, roč. 22, č. 2, s. 188–199. ISSN 02659247. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<188::AID-BIES10>3.0.CO;2-T
- [26] THIES, Roger. Morphology of Cardiac Muscle. nedatováno.
- [27] ZHENG, Ming, Rong HOU a Rui-Ping XIAO. Acidosis-induced p38 MAPK activation and its implication in regulation of cardiac contractility. *Acta pharmacologica Sinica* [online]. 2004, roč. 25, č. 10, s. 1299–305. ISSN 1671-4083. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15456531>
- [28] BERS, Donald M. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. nedatováno. ISBN 978-0-7923-7158-8.
- [29] BERS, Donald M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* [online]. 2002, roč. 415, č. 6868, s. 198–205. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/415198a
- [30] CHENG, H, W J LEDERER a M B CANNELL. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 1993, roč. 262, č. 5134, s. 740–4. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8235594>
- [31] SILVIA GUATIMOSIM, CRISTINA GUATIMOSIM, and Long-Sheng Song. Imaging Calcium Sparks in Cardiac Myocytes [online]. 2011, roč. 689, *Methods in Molecular Biology*, s. 1–9 [vid. 2012-11-02]. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-950-5
- [32] CHEN, X., L. GUO, J. KANG, Y. HUO, S. WANG a W. TAN. Calcium waves initiating from the anomalous subdiffusive calcium sparks. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2013, roč. 11, č. 91, s. 20130934–20130934. ISSN 1742-5689. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2013.0934
- [33] BOCK, Gregory R. a Kate ACKRILL, ed. *Ciba Foundation Symposium 188 - Calcium Waves, Gradients and Oscillations* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 1995. Novartis Foundation Symposia. ISBN 9780470514696. Dostupné z: doi:10.1002/9780470514696
- [34] SPERELAKIS, Nicholas. *Cell Physiology Source Book: Essentials of Membrane Biophysics*. nedatováno.
- [35] ISENBERG, Gerrit, Denis KONDRATEV, Vitaly DYACHENKO, Victor KAZANSKI a Maria Fiora GALLITELLI. *Isolated Cardiomyocytes: Mechanosensitivity of Action Potential, Membrane Current and Ion Concentration* [online]. 2005. ISBN 5769525908. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21290777>
- [36] FERRANTINI, C., C. CROCINI, R. COPPINI, F. VANZI, C. TESI, E. CERBAI, C. POGGESI, F. S. PAVONE a L. SACCONI. The transverse-axial tubular system of cardiomyocytes. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2013, roč. 70, č. 24, s. 4695–4710. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-013-1410-5

- [37] KLABUNDE, Richard E. *Non-Pacemaker Action Potentials* [online]. Dostupné z: <http://www.cvphysiology.com/Arrhythmias/A006.htm>
- [38] PAPP, Z, N PEINEAU, G SZIGETI, J ARGIBAY a L KOVÁCS. Calcium-dependent modulation of the plateau phase of action potential in isolated ventricular cells of rabbit heart. *Acta physiologica Scandinavica* [online]. 1999, roč. 167, č. 2, s. 119–29. ISSN 0001-6772. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-201x.1999.00599.x
- [39] BERS, Donald M. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circulation research* [online]. 2000, roč. 87, č. 4, s. 275–281. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/01.RES.87.4.275
- [40] CANNELL, M.B., C.H.T. KONG, M.S. IMTIAZ a D.R. LAVER. Control of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Release by Stochastic RyR Gating within a 3D Model of the Cardiac Dyad and Importance of Induction Decay for CICR Termination. *Biophysical Journal* [online]. 2013, roč. 104, č. 10, s. 2149–2159. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2013.03.058
- [41] ENDO, M. Calcium-Induced Calcium Release in Skeletal Muscle. *Physiological Reviews* [online]. 2009, roč. 89, č. 4, s. 1153–1176. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00040.2008
- [42] HUNTER SANDRA K., David A. Brown. *Muscle: the Primary Stabilizer and Mover of the Skeletal System* [online]. Dostupné z: <http://clinicalgate.com/muscle-the-primary-stabilizer-and-mover-of-the-skeletal-system/>
- [43] BARBA, David Torres. Assessment of Functional Activity in Isolated Cardiomyocytes Using Computational Methods by. 2011.
- [44] PHILIPS, Charles M a Steven R HOUSER. A Simple Technique to Measure the Rate and Magnitude of Shortening of Single Isolated Cardiac Myocytes. 1986, č. 10, s. 929–934.
- [45] HARRIS, Peter J., Donald STEWART, Michael C. CULLINAN, Leanne M. DELBRIDGE, Lindsay DALLY a Paul GRINWALD. Rapid Measurement of Isolated Cardiac Muscle Cell Length Using a Line-Scan Camera. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* [online]. 1987, roč. BME-34, č. 6, s. 463–467. ISSN 15582531. Dostupné z: doi:10.1109/TBME.1987.326081
- [46] PAOLINI, P J, R SABBADINI, K P ROOS a R J BASKIN. Sarcomere length dispersion in single skeletal muscle fibers and fiber bundles. *Biophysical journal* [online]. 1976, roč. 16, č. 8, s. 919–30. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(76)85742-6
- [47] PAOLINI, P J, K P ROOS a R J BASKIN. Light diffraction studies of sarcomere dynamics in single skeletal muscle fibers. *Biophysical journal* [online]. 1977, roč. 20, č. 2, s. 221–32. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(77)85545-8
- [48] ROOS, K P a A F LEUNG. Theoretical Fraunhofer light diffraction patterns calculated from three-dimensional sarcomere arrays imaged from isolated cardiac cells at rest. *Biophys J* [online]. 1987, roč. 52, č. 2, s. 329–341. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(87)83220-4
- [49] GANNIER, F., J. C. BERNENGO, V. JACQUEMOND a D. GAMIER. Measurements of Sarcomere Dynamics Simultaneously with Auxotonic Force in Isolated Cardiac Cells. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* [online]. 1993, roč. 40, č. 12, s. 1226–1232. ISSN 1558-2531. Dostupné z: doi:10.1109/10.250578
- [50] IWAZUMI, Tatuso a Gerald H. POLLACK. On-Line Measurement of Sarcomere Length from Diffraction Patterns in Muscle. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* [online]. 1979, roč. BME-26, č. 2, s. 86–93. ISSN 0018-9294. Dostupné z: doi:10.1109/TBME.1979.326514
- [51] LEUNG, A. F. Light diffractometry for determining the sarcomere length of striated muscle: an evaluation. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* [online]. 1983, roč. 4, č. 4, s. 473–484. ISSN 01424319. Dostupné z: doi:10.1007/BF00711950
- [52] DELBRIDGE, L M a K P ROOS. Optical methods to evaluate the contractile function of unloaded isolated cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* [online]. 1997, roč. 29, č. 1, s. 11–25. ISSN 0022-2828. Dostupné z: doi:10.1006/jmcc.1996.0247
- [53] SLAWNYCH, M P, L MORISHITA a B H BRESSLER. Spectral analysis of muscle fiber images as a means of assessing sarcomere heterogeneity. *Biophysical journal* [online]. 1996, roč. 70, č. 1, s. 38–47. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(96)79578-4
- [54] PETERSON, Pearu, Mari KALDA a Marko VENDELIN. Real-time determination of sarcomere length of a single cardiomyocyte during contraction. *American journal of physiology. Cell physiology* [online]. 2013, roč. 304, č. 6, s. C519–31. ISSN 1522-1563. Dostupné z: doi:10.1152/ajpcell.00032.2012
- [55] SERIZAWA, Takahiro, Takako TERUI, Tatsuya KAGEMOTO, Akari MIZUNO, Togo SHIMOZAWA, Fuyu KOBIRUMAKI, Shin'ichi ISHIWATA, Satoshi KURIHARA a Norio FUKUDA. Real-time measurement of the

- length of a single sarcomere in rat ventricular myocytes: a novel analysis with quantum dots. *American journal of physiology. Cell physiology* [online]. 2011, roč. 301, č. 5, s. 27. ISSN 0363-6143. Dostupné z: doi:10.1152/ajpcell.00161.2011
- [56] LITTLEFIELD, Ryan a Velia M FOWLER. Measurement of thin filament lengths by distributed deconvolution analysis of fluorescence images. *Biophysical journal* [online]. 2002, roč. 82, č. 5, s. 2548–64. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(02)75598-7
- [57] KAMGOUE, A., J. OHAYON, Y. USSON, L. RIOU a P. TRACQUI. Quantification of cardiomyocyte contraction based on image correlation analysis. *Cytometry Part A* [online]. 2009, roč. 75, č. 4, s. 298–308 [vid. 2012-10-26]. ISSN 15524922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.20700
- [58] HAYAKAWA, Tomohiro, Takeshi KUNIHIRO, Tomoko ANDO, Seiji KOBAYASHI, Eriko MATSUI, Hiroaki YADA, Yasunari KANDA, Junko KUROKAWA a Tetsushi FURUKAWA. Image-based evaluation of contraction-relaxation kinetics of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Correlation and complementarity with extracellular electrophysiology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* [online]. 2014, roč. 77, s. 178–191. ISSN 10958584. Dostupné z: doi:10.1016/j.yjmcc.2014.09.010
- [59] BAZAN, Carlos, David Torres BARBA, Peter BLOMGREN a Paul PAOLINI. Image processing techniques for assessing contractility in isolated adult cardiac myocytes. *International Journal of Biomedical Imaging* [online]. 2009, roč. 2009. ISSN 16874188. Dostupné z: doi:10.1155/2009/352954
- [60] LONDON, B a J W KRUEGER. Contraction in voltage-clamped, internally perfused single heart cells. *The Journal of general physiology* [online]. 1986, roč. 88, č. 4, s. 475–505. ISSN 0022-1295. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2228844&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [61] ČMIEL, Vratislav a Ivo PROVAZNIK. Systems for rapid simultaneous measurement of calcium transients and contractions of adult cardiomyocytes. In: Volker DECKERT a Nirmala RAMANUJAM, ed. [online]. 2013, s. 879810. Dostupné z: doi:10.1117/12.2033459
- [62] ČMIEL, V., J. ODSTRČILÍK, M. RONZHINA a I. PROVAZNÍK. Real-time measurement of cardiomyocyte contraction and calcium transients using fast image processing algorithms. In: [online]. 2015, s. 256–259. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-19387-8_62
- [63] RAPPAZ, Benjamin, Inkyu MOON, Faliu YI, Bahram JAVIDI, Pierre MARQUET a Gerardo TURCATTI. Automated multi-parameter measurement of cardiomyocytes dynamics with digital holographic microscopy. *Optics express* [online]. 2015, roč. 23, č. 10, s. 13333–47. ISSN 1094-4087. Dostupné z: doi:10.1364/OE.23.013333
- [64] GASKELL, Karen a David RAMSDELL. AFM Standard Operating Procedure. 2013, s. 1–23.
- [65] LIEBER, S. C. Aging increases stiffness of cardiac myocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* [online]. 2004, roč. 287, č. 2, s. H645–H651. ISSN 0363-6135. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.00564.2003
- [66] SAENZ COGOLLO, Jose F., Mariateresa TEDESCO, Sergio MARTINOIA a Roberto RAITERI. A new integrated system combining atomic force microscopy and micro-electrode array for measuring the mechanical properties of living cardiac myocytes. *Biomedical Microdevices* [online]. 2011, roč. 13, č. 4, s. 613–621. ISSN 1387-2176. Dostupné z: doi:10.1007/s10544-011-9531-9
- [67] ODSTRČILÍK, J.; ČMIEL, V.; KOLÁŘ, R.; RONZHINA, M.; BAI AZITOVA, L.; PEŠL, M.; PŘIBYL, J.; PROVAZNÍK, I. Computer Analysis of Isolated Cardiomyocyte Contraction Process via Advanced, Image Processing Techniques. *Computing in Cardiology*. nedatováno.
- [68] xCELLigence RTCA Cardio [online]. Dostupné z: <http://www.aceabio.com/product/rtca-cardio/>
- [69] WU, Yuejin, Tyler P. RASMUSSEN, Olha M KOVAL, Mei-ling A. JOINER, Duane D. HALL, Biyi CHEN, Elizabeth D. LUCZAK, Qiongling WANG, Adam G. ROKITA, Xander H.T. WEHRENS, Long-Sheng SONG a Mark E. ANDERSON. The mitochondrial uniporter controls fight or flight heart rate increases. *Nature Communications* [online]. 2015, roč. 6, s. 6081. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms7081
- [70] PLANK, David M. a Mark A. SUSSMAN. Intracellular Ca²⁺ measurements in live cells by rapid line scan confocal microscopy: simplified calibration methodology. *Methods in Cell Science* [online]. 2004, roč. 25, č. 3–4, s. 123–133. ISSN 1381-5741. Dostupné z: doi:10.1007/s11022-004-2043-8
- [71] PLANK, David M. a Mark A. SUSSMAN. Impaired Intracellular Ca²⁺ Dynamics in Live Cardiomyocytes Revealed by Rapid Line Scan Confocal Microscopy. *Microscopy and Microanalysis* [online]. 2005, roč. 11, č. 3, s. 235–243. ISSN 1431-9276. Dostupné z: doi:10.1017/S1431927605050488
- [72] PRATUSEVICH, V.R. a C.W. BALKE. Factors shaping the confocal image of the calcium spark in cardiac

- muscle cells. *Biophysical Journal* [online]. 1996, roč. 71, č. 6, s. 2942–2957. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(96)79525-5
- [73] BOOTMAN, Martin D, Daniel R HIGAZI, Stephen COOMBES a H Llewelyn RODERICK. Calcium signalling during excitation-contraction coupling in mammalian atrial myocytes. *Journal of cell science* [online]. 2006, roč. 119, č. Pt 19, s. 3915–25 [vid. 2012-11-08]. ISSN 0021-9533. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.03223
- [74] BOOTMAN, Martin D., Ioannis SMYRNIAS, Rüdiger THUL, Stephen COOMBES a H. Llewelyn RODERICK. Atrial cardiomyocyte calcium signalling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. 2011, roč. 1813, č. 5, s. 922–934. ISSN 01674889. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.030
- [75] CHENG, Heping, Long-Sheng SONG, Natalia SHIROKOVA, Adom GONZÁLEZ, Edward G. LAKATTA, Eduardo RÍOS a Michael D. STERN. Amplitude Distribution of Calcium Sparks in Confocal Images: Theory and Studies with an Automatic Detection Method. *Biophysical Journal* [online]. 1999, roč. 76, č. 2, s. 606–617. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(99)77229-2
- [76] HAMMER, K., A. FLOCKERZI, A. ZEUG, P. LIPP a L. KAESTNER. Calcium Spark Detection and Analysis in Time Series of Two-Dimensional Confocal Images. In: *EMC 2008 14th European Microscopy Congress 1–5 September 2008, Aachen, Germany* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, nedatováno, s. 387–388. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-85228-5_194
- [77] LOUGHREY, C. M., K. E. MACEACHERN, P. NEARY a G. L. SMITH. The Relationship between Intracellular $[Ca^{2+}]$ and Ca^{2+} Wave Characteristics in Permeabilised Cardiomyocytes from the Rabbit. *The Journal of Physiology* [online]. 2002, roč. 543, č. 3, s. 859–870. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.2002.021519
- [78] ENGEL, J., M. FECHNER, A.J. SOWERBY, S.A. FINCH a A. STIER. Anisotropic propagation of Ca^{2+} waves in isolated cardiomyocytes. *Biophysical Journal* [online]. 1994, roč. 66, č. 6, s. 1756–1762. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(94)80997-X
- [79] SHAW, R. M. a H. M. COLECRAFT. L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes. *Cardiovascular Research* [online]. 2013, roč. 98, č. 2, s. 177–186. ISSN 0008-6363. Dostupné z: doi:10.1093/cvr/cvt021
- [80] NYSTORIAK, Matthew A., Madeline NIEVES-CINTRÓN a Manuel F. NAVEDO. Capturing single L-type Ca^{2+} channel function with optics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. 2013, roč. 1833, č. 7, s. 1657–1664. ISSN 01674889. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2012.10.027
- [81] LUKYANENKO, Valeriy, Aristide CHIKANDO a W J LEDERER. Mitochondria in cardiomyocyte Ca^{2+} signaling. *The international journal of biochemistry & cell biology* [online]. 2009, roč. 41, č. 10, s. 1957–71. ISSN 1878-5875. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocel.2009.03.011
- [82] LANDGRAF, G., F.N. GELLERICH a M.H.P. WUSSLING. Inhibitors of SERCA and mitochondrial Ca-uniporter decrease velocity of calcium waves in rat cardiomyocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry* [online]. 2004, roč. 256, č. 1/2, s. 379–386. ISSN 0300-8177. Dostupné z: doi:10.1023/B:MCBI.0000009883.71379.51
- [83] KIRBY, M S, Y SAGARA, S GAA, G INESI, W J LEDERER a T B ROGERS. Thapsigargin inhibits contraction and Ca^{2+} transient in cardiac cells by specific inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump. *The Journal of biological chemistry* [online]. 1992, roč. 267, č. 18, s. 12545–51. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1320000>
- [84] SEDARAT, F, L XU, E D MOORE a G F TIBBITS. Colocalization of dihydropyridine and ryanodine receptors in neonate rabbit heart using confocal microscopy. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* [online]. 2000, roč. 279, č. 1, s. H202-9. ISSN 0363-6135. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899057>
- [85] CHARLOT, David, Victor CAMPA, Behrad AZIMI, Mark MERCOLA, Randall INGERMANSON, Patrick M. MCDONOUGH a Jeffrey H. PRICE. Automated calcium measurements in live cardiomyocytes. *2008 5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro* [online]. 2008, s. 316–319. Dostupné z: doi:10.1109/ISBI.2008.4540996
- [86] CHOI, B R a G SALAMA. Simultaneous maps of optical action potentials and calcium transients in guinea-pig hearts: mechanisms underlying concordant alternans. *The Journal of physiology* [online]. 2000, roč. 529 Pt 1, č. 2000, s. 171–188. ISSN 0022-3751. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00171.x
- [87] EFIMOV, Igor R., Vladimir P. NIKOLSKI a Guy SALAMA. Optical imaging of the heart. *Circulation Research* [online]. 2004, roč. 95, č. 1, s. 21–33. ISSN 00097330. Dostupné z: doi:10.1161/01.RES.0000121111.2004.09.1

- z: doi:10.1161/01.RES.0000130529.18016.35
- [88] WISLØFF, U, J P LOENNECHEN, G FALCK, V BEISVAG, S CURRIE, G SMITH a O ELLINGSEN. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovascular research* [online]. 2001, roč. 50, č. 3, s. 495–508. ISSN 0008-6363. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11376625>
 - [89] STERN, M D, S J SOLLOTT, B D ZIMAN, H S SILVERMAN, M C CAPOGROSSI, A TALO, E G LAKATTA, Cardiology DIVISION, Johns HOPKINS a Medical INSTITUTIONS. Cytostolic calcium and myofilaments in single rat cardiac myocytes achieve a dynamic equilibrium during twitch relaxation. 1992, s. 83–102.
 - [90] FAST, V G a R E IDEKER. Simultaneous optical mapping of transmembrane potential and intracellular calcium in myocyte cultures. *Journal of cardiovascular electrophysiology* [online]. 2000, roč. 11, č. 5, s. 547–556. ISSN 1045-3873. Dostupné z: doi:10.1111/j.1540-8167.2000.tb00008.x
 - [91] BERLIN, J R, M B CANNELL a W J LEDERER. Cellular origins of the transient inward current in cardiac myocytes. Role of fluctuations and waves of elevated intracellular calcium. *Circulation Research* [online]. 1989, roč. 65, č. 1, s. 115–126. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/01.RES.65.1.115
 - [92] BERLIN, J R a M KONISHI. Ca²⁺ transients in cardiac myocytes measured with high and low affinity Ca²⁺ indicators. *Biophysical journal* [online]. 1993, roč. 65, č. 4, s. 1632–47. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(93)81211-6
 - [93] RONZHINA, M, V CMIEL, O JANOUŠEK, J KOLÁŘOVÁ, M NOVÁKOVÁ, P BABULA a I PROVAZNÍK. Application of the optical method in experimental cardiology: action potential and intracellular calcium concentration measurement. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* [online]. 2013, roč. 62, č. 2, s. 125–37. ISSN 1802-9973. Dostupné z: doi:932369 [pii]
 - [94] DOUGLAS J. TAATJES, Brooke T. Mossman. *Cell Imaging Techniques: Methods and Protocols*. nedatováno.
 - [95] SIMPSON, Alec W. M. Fluorescent Measurement of [Ca²⁺]_i: Basic Practical Considerations. In: *Calcium Signaling Protocols* [online]. New Jersey: Humana Press, nedatováno, s. 3–30. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-250-3:3
 - [96] KAO, Joseph P Y, Gong LI a Darryl A AUSTON. Practical aspects of measuring intracellular calcium signals with fluorescent indicators. *Methods in cell biology* [online]. 2010, roč. 99, s. 113–52. ISSN 0091-679X. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374841-6.00005-0
 - [97] BOUCHARD, R A, R B CLARK a W R GILES. Effects of action potential duration on excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. Action potential voltage-clamp measurements. *Circulation research* [online]. 1995, roč. 76, č. 5, s. 790–801. ISSN 0009-7330. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7728996>
 - [98] FLUHLER, Eric, Valerie G BURNHAM a Leslie M LOEW. Spectra , Membrane Binding , and Potentiometric Responses of New Charge Shift Probest. 1985, s. 5749–5755.
 - [99] XU, Chang a Leslie M LOEW. The effect of asymmetric surface potentials on the intramembrane electric field measured with voltage-sensitive dyes. *Biophysical journal* [online]. 2003, roč. 84, č. 4, s. 2768–80. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(03)75081-4
 - [100] LOEW, Leslie M. Membrane Potential Imaging in the Nervous System: Methods and Applications [online]. 2011, s. 13–23. ISSN 0065-2598. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4419-6558-5
 - [101] CONTENTS, Page a Styryl DYES. Fast-Response Probes - Section 22.2. 2009, č. panel C, s. 3–5.
 - [102] LOEW, L M a L L SIMPSON. Charge-shift probes of membrane potential: a probable electrochromic mechanism for p-aminostyrylpyridinium probes on a hemispherical lipid bilayer. *Biophysical journal* [online]. 1981, roč. 34, č. 3, s. 353–65 [vid. 2012-11-08]. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(81)84854-0
 - [103] ČMIEL, V.; MRAVEC, F.; HALASOVÁ, T.; SEKORA, J.; PROVAZNÍK, I. Emission Properties Of Potential-Responsive Probe Di-4- ANEPPS. In *Analysis of Biomedical Signals and Images*. nedatováno.
 - [104] BYARS, Jonathan L., William M. SMITH, Raymond E. IDEKER a Vladimir G. FAST. Development of an Optrode for Intramural Multisite Optical Recordings of V_m in the Heart. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* [online]. 2003, roč. 14, č. 11, s. 1196–1202. ISSN 10453873. Dostupné z: doi:10.1046/j.1540-8167.2003.03203.x
 - [105] OMICHI, Chikaya, Scott T LAMP, Shien-Fong LIN, Junzhong YANG, Ali BAHAR, Shengmei ZHOU, Mina ATTIN, Moon-Hyoung LEE, Hrayr S KARAGUEUZIAN, Boris KOGAN, Zhilin QU, Alan GARFINKEL, Peng-Sheng CHEN a James N WEISS. Intracellular Ca dynamics in ventricular fibrillation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [online]. 2004, roč. 286, č. 10, s. 1836–1844. ISSN 0363-6135. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.00123.2003

- [106] MATIUKAS, Arvydas, Bogdan G MITREA, Arkady M PERTSOV, Joseph P WUSKELL, Mei-de WEI, James WATRAS, Andrew C MILLARD a Leslie M LOEW. New near-infrared optical probes of cardiac electrical activity. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* [online]. 2006, roč. 290, č. 6, s. H2633-43 [vid. 2012-11-08]. ISSN 0363-6135. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.00884.2005
- [107] WALTON, Richard D, Bogdan G MITREA, Arkady M PERTSOV a Olivier BERNUS. A novel near-infrared voltage-sensitive dye reveals the action potential wavefront orientation at increased depths of cardiac tissue. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference* [online]. 2009, roč. 2009, s. 4523–6. ISSN 1557-170X. Dostupné z: doi:10.1109/IEMBS.2009.5334106
- [108] LIBBUS, Imad a David S ROSENBAUM. Optical Mapping. In: *eLS* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2002. Dostupné z: doi:10.1038/npg.els.0003115
- [109] MEHTA, A., Y. Y. CHUNG, A. NG, F. ISKANDAR, S. ATAN, H. WEI, G. DUSTING, W. SUN, P. WONG a W. SHIM. Pharmacological response of human cardiomyocytes derived from virus-free induced pluripotent stem cells. *Cardiovascular Research* [online]. 2011, roč. 91, č. 4, s. 577–586. ISSN 0008-6363. Dostupné z: doi:10.1093/cvr/cvr132
- [110] Fluorescence Fundamentals [online]. nedatováno. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/introduction-to-fluorescence-techniques.html>
- [111] LAKOWICZ, Joseph R., ed. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [online]. Boston, MA: Springer US, 2006. ISBN 978-0-387-31278-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-46312-4
- [112] Fluorofory v biomedicině [online]. nedatováno. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>
- [113] Phase Contrast [online]. nedatováno. Dostupné z: https://www.jic.ac.uk/microscopy/more/T5_4.htm
- [114] BAZAN, Carlos, David TORRES BARBA, Peter BLOMGREN a Paul PAOLINI. Image processing techniques for assessing contractility in isolated neonatal cardiac myocytes. *International Journal of Biomedical Imaging* [online]. 2011, roč. 2011. ISSN 16874188. Dostupné z: doi:10.1155/2011/729732
- [115] SLUDER, G. *Digital Microscopy*. B.m.: Academic Press, 2007. ISBN 0123740258.
- [116] FAST, Vladimir G. Recording Action Potentials Using Voltage-Sensitive Dyes. In: *Practical Methods in Cardiovascular Research* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, nedatováno, s. 233–255. Dostupné z: doi:10.1007/3-540-26574-0_14
- [117] HIMEL IV, HD, J SAVARESE a N EL-SHERIF. The Photodiode Array : A Critical Cornerstone in Cardiac Optical Mapping. *Photodiodes - Communications, Bio-Sensings, Measurements and High-Energy Physics, edited by Jin-Wei Shi, ISBN 978-953-307-277-7, InTech, 2011*. 2011, s. 137–160.
- [118] JAMES A. SCULL†, LUKE C. MCSPADDEN†, HERMAN D. HIMEL IV, NIMA BADIE, and Nenad a BURSAC*. Single-detector Simultaneous Optical Mapping of Vm and [Ca2+]i in Cardiac Monolayers [online]. 2013, roč. 10, č. 1, s. 54–56. ISSN 1751-7370. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.2250.Digestion
- [119] KNISLEY, Stephen B, Robert K JUSTICE, Wei KONG a Philip L JOHNSON. Stephen B. Knisley, Robert K. Justice, Wei Kong and Philip L. Johnson. 2010, s. 1421–1433.
- [120] BOUEVITCH, O, a LEWIS, I PINEVSKY, J P WUSKELL a L M LOEW. Probing membrane potential with nonlinear optics. *Biophysical journal* [online]. 1993, roč. 65, č. 2, s. 672–9. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(93)81126-3
- [121] BAZAN, Carlos, Trevor HAWKINS, David TORRES-BARBA, Peter BLOMGREN a Paul PAOLINI. Introduction of non-linear elasticity models for characterization of shape and deformation statistics: application to contractility assessment of isolated adult cardiocytes. *BMC biophysics* [online]. 2011, roč. 4, s. 17. ISSN 2046-1682. Dostupné z: doi:10.1186/2046-1682-4-17
- [122] BAXTER, W T, J M DAVIDENKO, L M LOEW, J P WUSKELL a J JALIFE. Technical features of a CCD video camera system to record cardiac fluorescence data. *Annals of biomedical engineering* [online]. 1997, roč. 25, č. 4, s. 713–25. ISSN 0090-6964. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9236983>
- [123] Zyla 5.5 sCMOS [online]. Dostupné z: <http://www.andor.com/scientific-cameras/neo-and-zyla-scmos-cameras/zyla-55-scmos>
- [124] iXon3 860 [online]. Dostupné z: <http://www.andor.com/scientific-cameras/ixon-emccd-camera-series/ixon3-860>
- [125] X-Cite exacte [online]. Dostupné z: <http://www.excelitas.com/pages/product/X-Cite-exacte.aspx>
- [126] BACHTEL, Andrew D., Richard A. GRAY, Jayna M. STOHLMAN, Elliot B. BOURGEOIS, Andrew E. POLLARD a Jack M. ROGERS. A Novel Approach to Dual Excitation Ratiometric Optical Mapping of Cardiac Action

- Potentials With Di-4-ANEPPS Using Pulsed LED Excitation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* [online]. 2011, roč. 58, č. 7, s. 2120–2126. ISSN 0018-9294. Dostupné z: doi:10.1109/TBME.2011.2148719
- [127] STAFF, Alluxa Engineering. *Next-Generation Thin-Film Optical Filters for Life Sciences* [online]. Dostupné z: <http://www.alluxa.com/learning-center/item/39-next-generation-thin-film-optical-filters-for-life-sciences>
- [128] *Photometrics DC2* [online]. Dostupné z: <http://www.photometrics.com/products/multichannel/dc2.php>
- [129] *TuCam* [online]. Dostupné z: <http://www.andor.com/scientific-cameras/multi-wavelength-imaging/tucam>
- [130] LEE, H, S H PARK, S H NOH, J LIM a M S KIM. Development of a portable 3CCD camera system for multispectral imaging of biological samples. *Sensors (Basel)* [online]. 2014, roč. 14, č. 11, s. 20262–20273. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s141120262
- [131] AUSTERBERRY, David. *Three sensors or one* [online]. Dostupné z: <http://www.tvtechnology.com/production/0154/three-sensors-or-one/224383>
- [132] *W-VIEW GEMINI Image splitting optics* [online]. Dostupné z: https://www.hamamatsu.com/resources/pdf/sys/SBIS0101E_A1280101.pdf
- [133] *DualView Lambda* [online]. Dostupné z: <http://www.photometrics.com/products/datasheets/DVLambda-Datasheet.pdf>
- [134] *SuperK EXTREME supercontinuum lasers* [online]. Dostupné z: <http://www.nktphotonics.com/product/superk-extreme-supercontinuum-lasers/>
- [135] HAYASHI, Y, M M ZVIMAN, J G BRAND, J H TEETER a D RESTREPO. Measurement of membrane potential and [Ca²⁺]_i in cell ensembles: application to the study of glutamate taste in mice. *Biophysical journal* [online]. 1996, roč. 71, č. 2, s. 1057–70. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(96)79306-2
- [136] COGOLLO, Jose F Saenz, Mariateresa TEDESCO, Sergio MARTINOIA a Roberto RAITERI. A new integrated system combining atomic force microscopy and micro-electrode array for measuring the mechanical properties of living cardiac myocytes. *Biomedical Microdevices* [online]. 2011, roč. 13, č. 4, s. 613–621. ISSN 13872176. Dostupné z: doi:10.1007/s10544-011-9531-9
- [137] ITZHAKI, Ilanit, Sophia RAPOPORT, Irit HUBER, Itzhak MIZRAHI, Limor ZWI-DANTSIS, Gil ARBEL, Jackie SCHILLER a Lior GEPSTEIN. Calcium Handling in Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes. *PLoS ONE* [online]. 2011, roč. 6, č. 4, s. e18037. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0018037
- [138] WU, Zhaohua a Norden E. HUANG. Ensemble Empirical Mode Decomposition. *Advances in Adaptive Data Analysis* [online]. 2009, roč. 1, č. 1, s. 1–41. ISSN 1862278X. Dostupné z: doi:10.1515/BMT.2010.030
- [139] HUANG, NE, Z SHEN, SR LONG, MC WU, HH SHIH, Q ZHENG, NC YEN, CC TUNG a HH LIU. The empirical mode decomposition and the Hilbert spectrum for nonlinear and non-stationary time series analysis. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* [online]. 1998, roč. 454, č. 1971, s. 995, 903. ISSN 13645021. Dostupné z: doi:10.1098/rspa.1998.0193
- [140] LI, Xiujun, Jingbo HUANG, Glen F TIBBITS a Paul C H LI. Real-time monitoring of intracellular calcium dynamic mobilization of a single cardiomyocyte in a microfluidic chip pertaining to drug discovery. *Electrophoresis* [online]. 2007, roč. 28, č. 24, s. 4723–33 [vid. 2012-11-27]. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.200700312
- [141] NISHISHITA, Naoki, Takako YAMAMOTO, Chiemi TAKENAKA, Marie MURAMATSU a Shin KAWAMATA. Generation and Maintenance of iPSCs From CD34+Cord Blood Cells on Artificial Cell Attachment Substrate. In: *Pluripotent Stem Cell Biology - Advances in Mechanisms, Methods and Models* [online]. B.m.: InTech, 2014. Dostupné z: doi:10.5772/58591
- [142] SUHR, Jae Kyu. Kanade-Lucas-Tomasi (KLT) Feature Tracker. *Computer Vision (EEE6503)* [online]. 2009, s. 9–18. Dostupné z: [http://web.yonsei.ac.kr/jksuhr/articles/Kanade-Lucas-Tomasi Tracker.pdf](http://web.yonsei.ac.kr/jksuhr/articles/Kanade-Lucas-Tomasi%20Tracker.pdf)
- [143] ČMIEL, V.; ODSTRČILÍK, J.; SVOBODA, O.; BIAZITOVA, L.; PROVAZNÍK, I. Method for Adult Cardiomyocytes Long- Term Viability Monitoring Using Confocal Microscopy Techniques. *Computing in Cardiology*. nedatováno.
- [144] HERGHELEGIU, Paul a Vasile MANTA. Image processing techniques used in microscopic image segmentation. *Bul. Inst. Polit. Iași, t. LVII (LXI), f.2*. 2011, č. Lxi.
- [145] CONN, P. *Techniques in Confocal Microscopy*. B.m.: Academic Press, nedatováno.

Seznam obrázků

Obrázek 1.1 – Schéma znázorňující vznik, další procesy, metody měření a využití indukovaných pluripotentních kmenových buněk.	11
Obrázek 1.2 – Izolované kardiomyocyty potkana různé velikosti a tvaru zobrazeny pomocí světelné mikroskopie. Obrázek obsahuje měřítko velikosti [27]	13
Obrázek 1.3. Schéma znázorňující stěžejní procesy v rámci vazby excitace-kontrakce na úrovni buňky zahrnující molekulární signalizaci (vlevo) a výsledné signály charakterizující elektrickou, vápníkovou (signalizační) a mechanickou aktivitu srdeční buňky myokardu [29].	13
Obrázek 1.4 – Typický projev vápníkového záblesku zaznamenaný z komorového kardiomyocyty potkana s využitím vápníkového indikátoru Fluo-4 AM ([31]), vlevo, včetně ukázky analýzy charakteristik tohoto jevu (amplitudo s určením FDHM a FWHM, a) a vygenerovaný plastický model získaného vápníkového záblesku. Napravo jsou snímky pořízené opět s využitím fluorescenční mikroskopie a vápníkového indikátoru v osmi krocích po 100 ms u izolované srdeční buňky s uvedeným měřítkem 20 μm , barevná škála označuje umělého zabarvení dle relativní koncentrace intracelulárního vápníku v prostorovém rozložení [32].	14
Obrázek 1.5 – Akční napětí s číslováními fázemi (4 – klidová fáze, 0 – depolarizace, 1 – rychlá Repolarizace, 2 – fáze plató, 3 repolarizace). Pozičně jsou vyznačeny jednotlivé proudové složky, které se daných fází akčního napětí účastní. ERP vyznačuje efektivní refrakterní fázi, ve které nemůže vzniknout další akční napětí. [37]	15
Obrázek 1.6. – Schéma popisuje dvě varianty pozice tenkých a tlustých vláken – stav relaxace a stav plné kontrakce – s vyznačením jednotlivým pásem a odpovídajícím mikroskopickým snímkem (kosterního) svalu ve vysokém detailu [42]. Z – z-linie se zakotvením tenkých filament, A-proužek (je anizotropní v polarizovaném světle), I – světlý úsek tvořený aktinovými filamenti (je izotropní v polarizovaném světle)	16
Obrázek 1.7 – Průměrný signál kontrakce z [43] s detekovanými body t_0 , t_{max} a obdobně v 50 % amplitudy signálu a v 90 % amplitudy signálu, ze kterých probíhá výpočet fází uvedených v grafu: kontrakční fáze (Contraction Phase), relaxační fáze (Relaxation Phase), tu lze rozdělit na rychlou relaxační fázi (Fast Relaxation) a pomalou relaxační fázi (Slow Relaxation).	17
Obrázek 1.8 - Průměrný signál vápníkových transientů z [43] s detekovanými body t_0 (Onset, počáteční bod signálu), t_{Max} a obdobně v 90 % amplitudy signálu a v 100 % poklesu amplitudy signálu, ze kterých probíhá výpočet fází uvedených v grafu: fázi nárůstu signálu do maxima (Time to Peak) a fázi návratu do původní koncentrace vápníkových iontů v cytosolu (Recovery Time) rozdělenou na rychlou (Fast Relaxation) a pomalou relaxační fázi (Slow Relaxation).	17
Obrázek 2.1. Schéma vyjadřující model proužkování způsobeného úseky sarkomer uvnitř kardiomyocyty s demonstrací průchodu světla v případě uvolnění a kontrakce (A). V části (B) jsou vyznačeny jednotlivé typy pásem filament. Výsledná suma pixelů intenzity způsobuje průměrnou změnu vzdálenosti sarkomer o 8 % (C). [43]	19
Obrázek 2.2. Fluorescenční snímek kardiomyocyty značeného směsí kvantových teček anti-alfa-aktininu antibody-QD a FuGENE HD [55]. V obraze je možné v oblasti zájmu (vpravo nahoře) detekovat velmi úzké úseky značené kvantovými tečkami a hodnotit jejich pozici.	20
Obrázek 2.3. Příklad snímku kardiomyocyty ve třech různých časových intervalech v případě postupné kontrakce (2A-C) a odpovídající provedená vektorová analýza napravo.	21
Obrázek 2.4 – A) Ukázka jednoho snímku využitého pro obrazovou analýzu pořízeného světelnou mikroskopií s využitím fázového kontrastu a ukázkou výběru oblasti zájmu – výběru objektu, na kterém probíhá následná analýzy. B) Tři snímky v ROI v odlišných časových okamžicích, v dolní části pak přiřazená vrstva s umělým obarvením dle zjištěné rychlosti pohybu pixelů v μm odpovídající vhodně vybraným pozicím C) v extrahovaném signálu. D) extrahovaný signál kontrakce a relaxace udávaný v průměrné rychlosti pixelů za sekundu v širším časovém úseku s šesti cykly. Zdroj [58].	22
Obrázek 2.5 – a) Detekovaná kontura kardiomyocyty při změna tvaru (délky a natočení). b) Odpovídající sada Fourierových deskriptorů citlivá na změnu tvaru, rotaci, translaci a invariaci počátečního bodu. Převzato z [59].	23
Obrázek 2.6 – Ukázka snímků OPD získaných v maximu kontrakce (a) a klidové fázi (b). Na c) je znázorněn rozdíl po provedení subtrakce snímků. Zdroj [63]	24

Obrázek 2.7 – Schéma zařízení mikroskopie atomárních sil [64].	25
Obrázek 2.8 – Tvar měřeného shluku kardiomyocytů (EB) metodou AFM a způsob položení hrotu na EB (A); ukázka získaného silového signálu se špičkami kontrakce a vyznačením hledaných parametrů (B). Detekce nárůstu síly (C).	26
Obrázek 2.9 – Shluk kardiomyocytů (iPSC-CM EB), získaný 60s signál a statistické hodnocení detekovaných parametrů (síly, frekvence, šířky pulzů).	26
Obrázek 2.10 – A) Vícejamkové pole s navařenými elektrodami na dně misek. Impedance odpovídající množství buněk v jednom elektrodovém systému. B) Nulový index buněk v případě jejich absence (vlevo), na další ukázce leva změna indexu vlivem jedné buňky přítomné na elektrodovém poli, na dalších dvou obrázcích pak změna indexu buněk u vyššího počtu buněk při relaxaci (b1) a při kontrakci (b2). Index vychází z měřené impedance [68]. Spodní obrázek tvoří mikroskopický snímek – ukázka reálného elektrodového pole a shluků adherovaných buněk.	27
Obrázek 2.11 – Schéma vyjadřující tři skupiny vápníkových indikátorů pro poměrové a nepoměrové (a) měření. Poměrové měření lze rozdělit jako poměrové měření v excitaci (c) anebo v emisi (b). [93]	28
Obrázek 2.12 - Vlevo emisní spektrum Fluo-3 s ukázkou změny emisního spektra (závislost relativní fluorescence na vlnových délkách) v závislosti na koncentraci volného vápníku. Vpravo je uveden seznam variant indikátorů Fluo s chemickou strukturou a disociační konstantou.	29
Obrázek 2.13 – Di-4-ANEPPS a jeho spektra v různém prostředí [103].	31
Obrázek 2.14 – Začleněný styrylového barviva (VSD) do membrány a následná reakce na její depolarizaci (vlevo). Vpravo struktura styrylového barviva a změna konformace v závislosti na depolarizaci membrány. [100].	31
Obrázek 2.15 – Princip měření akčního napětí s využitím napěťově citlivého barviva [108].	32
Obrázek 2.16 – Mapování elektrické aktivity (A-C) s využitím mikroelektrodového pole s ukázkou efektu na frekvenci špiček v signálu při aplikaci farmakologických látek: Bay K 8644 (D and E), isoprenaline (F), verapamil (G a H) a carbamycholin (I). [109]	33
Obrázek 4.1 – Jablonského diagram s elektronovými pásmy (vlevo), spektrální oblast s odlišnými intenzitami jasu fluorescence při různé úrovni excitace. [110].	35
Obrázek 4.2 – Optický model invertovaného epi-fluorescenčního mikroskopu se základními prvky, které mají vztah k realizaci vícekanálových experimentů. BF – bariérový filtr, MD – dichroické zrcadlo, EF – emisní filtr. Napravo je optické schéma mikroskopu Olympus řady IX vyjadřující integrované optické prvky a optickou cestu, včetně ukázky dostupných výstupních portů. V pravé části obrázku je obsažen pohled z přední strany na mikroskop, na levé části obrázku z levého boku mikroskopu.	37
Obrázek 4.3 – Obrazy kardiomyocytů pořízených na konfokálním mikroskopu ve světlém poli (A-D), A – se zaostřením na běžnou rovinu buňky, B a C se zaostřením nad a pod hlavní rovinu buňky a vzniklý efekt zesvětlení blízkého okolí sarkolemy, D – obraz získaný s využitím polarizační metody, objekt je ve výsledku značně plastický. Napravo je kardiomyocyt zobrazení kontrastní metodou ve s využitím fázového kontrastu [57].	38
Obrázek 4.4 – Princip fázového kontrastu u vzpřímeného mikroskopu. Podstatnými prvky jsou fázové kroužky obsažené v kondenzoru a objektivu mikroskopu. Úprava objektivu však způsobuje útlum emisního fluorescenčního světla procházejícího objektivem. Zdroj [113].	39
Obrázek 4.5 – Porovnání kvantové účinnosti a spektrální citlivosti kamer Andor Zyla 5.5 (vlevo, sCMOS) a Andor iXon3 860 (vpravo, EMCCD).	40
Obrázek 4.6 - Porovnání rozměrů čipů kamer Olympus i-Speed 3 (větší) a Andor iXon 860.	41
Obrázek 4.7 – Příklad snímkovacích rychlostí kamery Andor iXon 860 (nahore) a Zyla 5.5 (dole) v případě variability rozlišení a možnosti funkce „binning“ – sloučení pixelů v celek a u Zyla 5.5 s rozlišením užití globální a rolovací uzávěrky. [123, 124].	42
Obrázek 4.8 – Sestava potřebných prvků při realizaci vícekanálového zobrazování s přepínáním filtrů v čase. Při přepínání dochází k výměně filtrů v oblasti excitace a také v oblasti emise, a to pomocí fluorescenčních kostek.	43
Obrázek 4.9 – Schematické znázornění poměrového měření v oblasti excitace. Ke střídavé výměně dvou a více filtrů dochází jen v oblasti excitace, přímo u fluorescenčního zdroje.	43
Obrázek 4.10 – Sestava s využitím rychle přepínatelného excitačního zdroje.	44

Obrázek 4.11 – Ukázka realizace fluorescenčního měření dvou barviv (MitoTracker a EYFP) s využitím duálních excitačních a emisních filtrů umístěných v jedné fluorescenční kostce. Zdroj [127]	44
Obrázek 4.12 – Ukázka vícekanálového zobrazování s využitím barviv (A405, Cy2, Cy3, Cy5) s využitím sady dichromatických zrcadel a separátními excitačními vlnovými délkami s využitím jednoho snímáče (vlevo) a varianta s využitím současné excitace skupiny barviv (Cy5, Cy5.5, Cy7) a naopak využitím více snímačů s optickým rozdělením pomocí dichromatických zrcadel.....	45
Obrázek 4.13 – Schematické znázornění umístění řazení prvků v případě využití optického rozbočovače. V rotačním výměníku filtrů je vybrán vhodný jedno nebo vícepásmový filtr pro excitaci. Emisní filtry jsou obvykle umístěny před snímači. Sestavu lze realizovat také s vícepásmovým zdrojem (např. zdrojem se skupinou současně aktivovaných LED).....	45
Obrázek 4.14 – Princip tříkanálové kamery se třemi oddělenými CCD snímači. Rozdělení optické osy na tři spektrální části probíhá pomocí dichromatických zrcadel. Zdroj [131]	46
Obrázek 4.15 – Schematické znázornění sestavy s využitím vícečipové kamery. Obdobným způsobem jako u sestavy uvedené na Obrázek 4.13 je nutné zajistit výběr vlnových pro excitaci aplikovaných barviv.	46
Obrázek 4.16 – Optické zařízení Andor Optosplit. Vstupující paprsky jsou spektrálně rozděleny na dvojici dichromatických zrcadel a po filtraci jsou druhou sadou zrcadel svedeny do společné cesty, avšak s malým posunem.	46
Obrázek 4.17 – Sestava s využitím optického adaptéru, který je připojen na výstupní port mikroskopu a k němu je připojena jedna kamera. Vhodný excitační filtr musí zajišťovat současnou excitaci dvou použitých barviv.	46
Obrázek 4.18 – Obrazový čip kamery čtvercového tvaru (např. Andor iXon 860), na který jsou promítnuty dva objekty ze dvou kruhových zorných polí z červené spektrální oblasti ZP1 a zelené spektrální oblasti ZP2 s nastaveným horizontálním posunem (d) a případným nežádoucím vertikálním posunem vzniklým nepřesností realizace opto-mechanického provedení systému. Objekty znázorňují dva podlouhlé izolované kardiomyocyty..	47
Obrázek 4.19 – Princip AOBS filtru, který vytváří ve spektru velmi úzká pásma pro laserové čáry (vlevo). Vpravo je zobrazen detekční systém používaný u konfokálního mikroskopu Leica (TCS SP8). 1) značí optický hranol, na kterém dochází k prostorovému rozložení světelného svazku s více spektrálními oblastmi a následně je pomocí zásuvných mechanických prvků (2) spektrum dále rozděleno a odraženo na příslušné detekční prvky (fotonásobiče, 3)).	48
Obrázek 5.1– Spektrální oblast vlnových délek s vymezením oblastí pro současné měření Fluo-4 a zobrazení ve světlém poli.	50
Obrázek 5.2 – Spektrální oblast vlnových délek s vymezením oblastí pro současné měření Indo-1 a zobrazení ve světlém poli.	51
Obrázek 5.3 – Spektrální oblast vlnových délek s vymezením oblastí pro současné měření Fura-2 a zobrazení ve světlém poli.	51
Obrázek 5.4 - Spektrální oblast vlnových délek s vymezením oblastí pro současné měření s Fluo-4 a Di-4-ANEPPS poměrovou metodou.	52
Obrázek 5.5 - Spektrální oblast vlnových délek s vymezením oblastí pro současné měření s Fura-2 a Di-4-ANEPPS nepoměrovou metodou.	52
Obrázek 5.6 - Spektrální oblast vlnových délek s vymezením oblastí pro současné měření s Fluo-4 a Di-4-ANEPP nepoměrovou metodou.	53
Obrázek 5.7 – Schéma navržených optických adaptérů pro vícekanálové měření. A – optický rozbočovač pro dvě kamery, B – optický systém pro promítání spektrálně rozděleného obrazu vedle sebe na jeden čip kamery.	54
Obrázek 5.8 – Vlevo je zobrazen návrh adaptéru pro rozbočení optické cesty ke dvěma kamerám, vpravo je vyobrazena spektrální oblast ve viditelné oblasti světla se spektry Fluo-4. Zelenou a oranžovou barvou jsou vyznačeny rozsahy spekter pro optimální propustnost fluorescence i průchozího světla. Na vodorovné vlnových délek jsou vyznačeny významné vlnové délky (v nm), svislá osa značí relativní intenzitu fluorescence.	55
Obrázek 5.9. Srovnání průchodnosti fluorescence Fluo-4 fluorescenční kostkou bez využití a s využitím přidavných dichromatických zrcadel.	56
Obrázek 5.10 - Rozsah analyzované oblasti spektra fluorescenčního barviva Fluo-4 (vlevo), výsledky analýzy propustnosti (vpravo) s využitím různých optických prvků. V pravé části jsou uvedeny pozice prvků, buď se	

nachází ve fluorescenční kostce mikroskopu IX-71, anebo se jedná o prvky v optickém adaptéru odpovídající schématu na Obrázek 5.8.	57
Obrázek 5.11 – Spektrum v oblasti průchozího světla. Světlo halogenové lampy a snížení její relativní intenzity průchodem přes dichromatické zrcadlo a optické filtry při průchodu systémem.	57
Obrázek 5.12. Realizace optického rozbočovače. S kamerou Andor iXon a Olympus i-Speed 3 vlevo, s dvojicí kamer Andor iXon vpravo.	58
Obrázek 5.13 – Schéma adaptéru pro spektrální rozdělení obrazu a promítnutí dvou oddělených obrazů na jeden čip kamery.	58
Obrázek 5.14 – Ukázka realizovaného optického adaptéru s portem pro připojení k mikroskopu na straně jedné a s úchytem C-mount pro kameru na straně druhé. Na fotografiích je adaptér bez krytu, při použití je využit plechový černý kryt pro zastínění optických prvků od vnějšího světla. K řízení posuvu jednoho ze zrcadel slouží otočný prvek s měřítkem (detailněji je ozobrazeno na pravém snímku). Držák fluorescenčních kostek je umístěn na nastavitelném podstavci. Ten umožňuje jemný posun zrcadla ve svislé ose.	59
Obrázek 6.1 - Schéma experimentální (A) a výpočetní (B) části. Schéma zahrnuje obecný použitý postup od přípravy vzorku po hodnocení získaných signálů.	60
Obrázek 6.2 – Varianta experimentů, kde je nejdříve pořízen kontrolní signál a následně po aplikaci testované látky po ustálení (a vhodné časové prodlevě) pořízen signál za stejných podmínek s aplikovanou testovanou látkou.	61
Obrázek 6.3 – Aplikace testované látky. 1 – Měřený objekt, 2 – Držák s hrotem u AFM modulu, 3 – AFM zařízení, 4 – Laserový zdroj pro AFM, 5 – Přívodní a odvodní hadička pro médium, 6 – Peristaltická pumpa napojená na hadičku, 7 – Stříčka s testovanou látkou.	61
Obrázek 6.4 - Varianta experimentů, kde je nejdříve pořizován kontrolní signál a při neustále probíhající akvizici proběhne vhodnou formou (např. s využitím rychlého perfuzního systému) výměna roztoku anebo vpravení testované látky lokálně a dojde k ovlivnění fyziologických parametrů měřeného objektu. Nárůst změn je také zaznamenán a hodnocen.	62
Obrázek 6.5 – Dva po sobě následující cykly (obecný n a $n-1$ cyklus) vápníkových transientů po filtraci metodou EEMD. V obrázku jsou vyznačeny pojmy PtP a PA jako časová vzdálenost mezi špičkami (mezi maximy cyklů) a jejich amplituda.	63
Obrázek 6.6 – Průměrovaný signál vápníkových transientů získaný v Praktické části A, na kterém jsou vyznačeny detekované stěžejní body pro rozměření a funkční parametry vycházejících ze vzdáleností mezi těmito body. ..	64
Obrázek 6.7 - Průměrovaný signál kontrakce získaný v Praktické části A, na kterém jsou vyznačeny detekované stěžejní body pro rozměření a funkční parametry vycházejících ze vzdáleností mezi těmito body.	65
Obrázek 6.8 – Matice detekovaných parametrů pro vápníkový signál	66
Obrázek 6.9 - Matice detekovaných parametrů pro signál kontrakce	66
Obrázek 7.1 – Ukázka pracoviště s mikroskopem Olympus FluoView FV1200, zařízením JPK NanoWizard a připojenou kamerou Andor Zyla 5.5.	68
Obrázek 7.2 – A. Ilustrace vyjadřující realizaci technického řešení optické části zařízení a připojení modulu AFM. Hlavice modulu AFM JPK NanoWizard (1) je připojena nad stolek (2) mikroskopu, ve kterém je uchycen vzorek. Hrot je v kontaktu s měřeným objektem. Vzorek je nasvícen excitačním světlem přivedeným z externího zdroje (6) a fluorescenční emise použitého barviva Fluo-4 prostupuje zpět objektivem přes fluorescenční kostku (3) až ke kameře (5). Spolu s fluorescenčním světlem ke snímači postupuje laserové rozptýlené záření, které je filtrováno filtrem typu dolní propust (Thorlabs FES 650). Ke snímači však prochází ještě malá část záření. B. Detail oblasti misky se vzorkem.	69
Obrázek 7.3 – Snímek s měřeným objektem (EB) vlevo, vpravo fluorescenční snímek obsahující fluorescenci Fluo-4 u zbytkového vápníku v klidovém stavu a artefakt vzniklý rozptýleným laserovým světlem.	70
Obrázek 7.4 – Signál získaný z vyznačené oblasti v softwaru Andor SOLIS. Signál je dán sumou pixelů oblasti v čase.	70
Obrázek 7.5 – Schéma potupu pro získání signálů optickou metodou a pomocí zařízení AFM, filtrace čtyřmi různými postupy a další hodnocení analyzovaných signálů. Úseky odlišené přerušovanou čarou, barevně odlišené, znázorňují odlišné procesy pro data AFM a data získaná opticky.	71

Obrázek 7.6 – Oblast zájmu, ze které byly získány vápníkové transienty (vlevo). Alternativní oblasti použité pro porovnání signálů z různých ROI (vpravo).	72
Obrázek 7.7 – 29s úsek získaných vápníkových transientů před filtrací (vlevo), detail signálu (vpravo).	72
Obrázek 7.8 – Signály získané pro jednotlivé ROI z Obrázek 7.6 (vpravo) detekcí špiček signálu a jejich vynesemím do grafu a následným zobrazením formou spojnicového grafu. U signálů špiček některých ROI jsou patrné lokální odchylky.	73
Obrázek 7.9 – 29s úsek výškového AFM signálu. Vlevo po nasnímání a načtení, vpravo invertovaný.	74
Obrázek 7.10 – Původní signál s vyznačením driftu a signál po odstranění driftu.	74
Obrázek 7.11 – Výsledek po nalezení středové linie signálu a posun této linie na úroveň nuly.	75
Obrázek 7.12 – Souvislost mezi výškovým a silovým signálem AFM.	75
Obrázek 7.13 – Spektra signálů získaných po aplikaci kofeinu. Nalevo spektrum signálu vápníkových transientů (získaných opticky) a napravo spektrum signálu kontrakce pořízeného s využitím mikroskopie atomárních sil.	76
Obrázek 7.14 – Detail vápníkového signálu (vlevo) a signálu AFM (vpravo) po provedené filtraci.	76
Obrázek 7.15 – Frekvenční charakteristika FIR filtru použitého pro filtraci AFM signálu.	77
Obrázek 7.16 – Frekvenční charakteristika FIR filtru použitého pro filtraci AFM signálu.	77
Obrázek 7.17 – Ukázka vlivu filtrace FIR na výškový AFM signál. 3s úsek normalizovaného signálu.	78
Obrázek 7.18 – Ukázka vlivu filtrace FIR na signál vápníkových transientů. 3s úsek normalizovaného signálu.	78
Obrázek 7.19 – Ukázka vlivu filtrace EEMD na výškový AFM signál. 3s úsek normalizovaného signálu.	79
Obrázek 7.20 – Ukázka vlivu filtrace EEMD na signál vápníkových transientů. 3s úsek normalizovaného signálu.	79
Obrázek 7.21 – Ukázka vlivu mediánové filtrace na signál vápníkových transientů. 3s úsek normalizovaného signálu.	80
Obrázek 7.22 – Získaný signál vápníkových transientů s vyznačenými body t_0 , t_{max} a t_{100} . Z ukázek je patrné, že se body t_{max} a t_{100} v některých případech překrývají. Shodné pozice t_0 a t_{100} jsou patrné zejména u signálu vápníkových transientů, kde koncentrace vápníkových iontů po poklesu na konci cyklu bezprostředně začíná narůstat v dalším cyklu. Zatímco u signálů AFM je patrná prodleva mezi jednotlivými cykly.	80
Obrázek 7.23 – Výškový signál pořízený AFM. Všechny zobrazené signály obsahují detekované body t_0 , t_{max} a t_{100} . Některé pozice t_0 a t_{max} se překrývají, ale děje se tak spíše zřídka.	81
Obrázek 7.24 – Spektrum kontrolního signálu (nahore) a testovacího signálu po aplikaci kofeinu (dole). Základní harmonická složka je označena F a vyšší harmonické složky signálu čísly.	83
Obrázek 7.25 – Četnosti detekovaných frekvencí špiček kontrolního AFM signálu vynesené formou histogramu. Vypočtená průměrná hodnota frekvencí je zobrazena červenou svislicí, nejčastější hodnota zelenou.	83
Obrázek 7.26 – Četnosti detekovaných frekvencí špiček AFM signálu získaného po aplikaci kofeinu vynesené formou histogramu. Vypočtená průměrná hodnota frekvencí je zobrazena červenou svislicí, nejčastější hodnota zelenou.	84
Obrázek 7.27 – Histogramy vyjadřující četnost detekovaných frekvencí špiček ve srovnání kontrolního signálu (modrá) a signálu získaného po aplikaci kofeinu (oranžová) zvlášť po provedení jednotlivých typů filtrací. Vypočtené průměrné hodnoty frekvencí špiček jsou zobrazeny červenou svislicí. Zelenou svislicí jsou detekované nejčastější frekvence.	85
Obrázek 7.28 – Rozložení získaných maxim detekovaných špiček PA v kontrolním signálu vyjádřené pomocí krabicových grafů. Křabicové grafy ukazují nejnižší a nejvyšší hodnotu amplitudy, medián všech hodnot a variabilitu hodnot s ohraničením.	86
Obrázek 7.29 – Rozložení získaných maxim detekovaných špiček PA v signálu získaném po aplikaci kofeinu vyjádřené pomocí krabicových grafů. Křabicové grafy ukazují nejnižší a nejvyšší hodnotu amplitudy, medián všech hodnot a variabilitu hodnot s ohraničením.	86
Obrázek 7.30 – Společný histogram znázorňující rozložení četností parametrů CP, FR, SR a PW vždy v porovnání parametrů vycházejících z kontrolního signálu (modrá) a ze signálu získaného po aplikaci kofeinu (oranžová).	87
Obrázek 7.31 – Společný histogram znázorňující rozložení četností parametrů CP, FR, SR a PW vždy v porovnání parametrů vycházejících z kontrolního signálu (modrá) a ze signálu získaného po aplikaci kofeinu (oranžová).	88

Obrázek 7.32 – Průměrný signál kontrakce před a po aplikaci kofeinu. Jedná se o filtrovaný zprůměrovaný signál, který prošel procesem filtrace metody EEMD. V obrázku jsou vyznačeny detekované průměrné stěžejní body t_0 t_{50l} a t_{50r} , t_{max} , t_{90} a t_{100} . Z obrázku jsou patrné změny, které vyvolal vliv kofeinu. Změny se projeví ve tvaru a amplitudě signálu. Amplituda je vyjádřena ve změnách výšky v μm u výškového signálu AFM.	89
Obrázek 7.33 - Spektrum kontrolního signálu vápníkových transientů (nahore) a testovacího signálu po aplikaci kofeinu (dole). Základní harmonická složka je označena F a vyšší harmonické složky signálu čísly.	90
Obrázek 7.34 – Četnost detekovaných frekvencí spektra špiček kontrolního signálu vápníkových transientů. Vypočtená průměrná hodnota frekvencí je zobrazena červenou svislicí, nejčastější hodnota zelenou.	90
Obrázek 7.35 – Četnost detekovaných frekvencí spektra špiček signálu vápníkových transientů, který byl získán po aplikaci kofeinu. Vypočtená průměrná hodnota frekvencí je zobrazena červenou svislicí, nejčastější hodnota zelenou.	91
Obrázek 7.36 – Histogramy četností detekovaných frekvencí ze spektra frekvencí špiček pro kontrolní signál (modře) a signál s aplikací kofeinu (žlutě). Průměrné hodnoty jsou vyznačeny červenou svislicí a nejčastější hodnoty zelenou svislicí.	92
Obrázek 7.37 - Rozložení získaných maxim detekovaných špiček PA v signálu získaném u kontrolního vápníkového signálu vyjádřené pomocí krabicových grafů. Krabicové grafy ukazují nejnižší a nejvyšší hodnotu amplitudy, medián všech hodnot a variabilitu hodnot s ohraničením.	92
Obrázek 7.38 - Rozložení získaných maxim detekovaných špiček PA ve vápníkovém signálu získaném po aplikaci kofeinu vyjádřené pomocí krabicových grafů. Krabicové grafy ukazují nejnižší a nejvyšší hodnotu amplitudy, medián všech hodnot a variabilitu hodnot s ohraničením.	93
Obrázek 7.39 - Průměrný signál vápníkových transientů před a po aplikaci kofeinu. Jedná se o filtrovaný zprůměrovaný signál, který prošel nejdříve procesem filtrace metodou EEMD. V obrázku jsou vyznačeny detekované průměrné stěžejní body t_0 t_{50l} a t_{50r} , t_{max} , t_{90} , t_{80} a t_{100} . Z obrázku jsou patrné změny, které vyvolal vliv kofeinu. Změny se projeví ve tvaru a amplitudě signálu. Amplituda je vyjádřena ve změnách sumy hodnot pixelů v oblasti zájmu (vyjadřující detekovanou změnu fluorescence).	94
Obrázek 8.1 – Snímky EB pořízené mikroskopií ve světlém poli kamerou Andor Zyla 5.5 v rozlišení zhruba 1500 x1500 px se zvětšení objektivem 20X.	98
Obrázek 8.2 – Ukázka shodného objektu jako Obrázek 8.1 D se dvěma odlišnými optickými rovinami ostření. A – objekt je zaostřen na rovinu umístěnou nejbližší podložní misce a vysokou ostrost v tomto případě vykazují hraniční úseky objektu, B – objekt je zaostřen na horní (středovou) část. Hraniční úseky z A jsou rozostřené.	99
Obrázek 8.3 - Signály získané sumou pixelů v oblastech zájmu 1 a 2, normalizované do mezí 0 – 1.	100
Obrázek 8.4 – Signály extrahované z oblastí zájmu ROI1 a ROI2 ve vzájemném porovnání (nahore), dole odlišný signál z oblasti ROI3.	100
Obrázek 8.5 – Schéma demonstrující postup při zpracování N snímků pořízeného videozáznamu pro získání hranice v oblasti zájmu. Ve schématu je uvedena ukázka segmentace a nalezení hranice z celých snímků, ROI je vyznačena symbolicky, blíže je specifikována na Obrázek 8.6.	101
Obrázek 8.6 – Vlevo – Snímek s vyznačením tří oblastí s nerovnostmi na hranici EB; Vpravo – Snímek s vyznačenými dvěma oblastmi zájmu	102
Obrázek 8.7 – A – vstupní snímek, B – vyznačená oblast zájmu, D – binární oblast po segmentaci obrazu se správným nastavením parametrů, C a E s nepřesným nastavením vstupních parametrů, F – výsledný snímek po úpravě morfologickými funkcemi s vyznačenou hranicí objektu (inverzního objektu), G – obdobný postup pro vyznačenou oblast zájmu v původní velikosti.	103
Obrázek 8.8 – Hranice získaná hranovou detekcí (vlevo), hranice po úpravě dilatací a detekovaná hranice v oblasti zájmu pro výpočet délky hranice (červeně).	103
Obrázek 8.9 – Ukázka 10s úseku signálu získaného metodou PIX v oblasti ROI1 (červeně) ve srovnání s referenčním AFM výškovým signálem (modře). Dole jsou detekované špičky obou signálů vyjádřené stopkovým grafem, ze kterého jsou patrné amplitudové a časové odlišnosti v jednotlivých cyklech.	105
Obrázek 8.10 – Ukázka 10s úseku signálu získaného metodou THR v oblasti ROI1 (červeně) ve srovnání s referenčním AFM výškovým signálem (modře). Dole jsou detekované špičky obou signálů vyjádřené stopkovým grafem, ze kterého jsou patrné amplitudové a časové odlišnosti v jednotlivých cyklech.	106

Obrázek 8.11 – Ukázka 10s úseku signálu získaného metodou SNK v oblasti ROI1 (červeně) ve srovnání s referenčním AFM výškovým signálem (modře). Dole jsou detekované špičky obou signálů vyjádřené stopkovým grafem, ze kterého jsou patrné amplitudové a časové odlišnosti v jednotlivých cyklech.	106
Obrázek 8.12 – Porovnání nalezených period TP2P pro signály PIX, THR a SNK v porovnání s referenčním AFM formou histogramů.	107
Obrázek 8.13 – Porovnání detekovaných AP2P pro signály PIX, THR a SNK v porovnání s referenčním AFM formou krabicových grafů.	107
Obrázek 8.14 – Ukázka 10s úseku signálu získaného metodou PIX v oblastech ROI0 celého snímku ve srovnání se signálem z užšího výběru. Dole jsou detekované špičky obou signálů vyjádřené stopkovým grafem, ze kterého jsou patrné amplitudové a časové odlišnosti v jednotlivých cyklech.	108
Obrázek 8.15 – Ukázka 10s úseku signálu získaného metodou THR v oblastech ROI0 celého snímku ve srovnání se signálem z užšího výběru. Dole jsou detekované špičky obou signálů vyjádřené stopkovým grafem, ze kterého jsou patrné amplitudové a časové odlišnosti v jednotlivých cyklech. Z ukázky je patrná chybná detekce (falešných špiček) u oblasti ROI0.	109
Obrázek 8.16 – Ukázka 10s úseku signálu získaného metodou PIX v oblastech ROI0 celého snímku ve srovnání se signálem z užšího výběru. Dole jsou detekované špičky obou signálů vyjádřené stopkovým grafem, ze kterého jsou patrné amplitudové a časové odlišnosti v jednotlivých cyklech.	109
Obrázek 8.17 – Krabicové grafy vyjadřující statistiku amplitudy signálových špiček v ROI0.	110
Obrázek 8.18 – Snímek hranice EB v rozlišení 1700 x 1700 px (zvětšení objektivem 40X) s vyznačenými čtyřmi odlišnými oblastmi.	111
Obrázek 8.19 – Signály získané metodou PIX (viz Tabulka 8.1) pro 4 odlišné ROI. Signály vykazují vysokou tvarovou shodu a minimální odchylku v detekovaných špičkách.	111
Obrázek 8.20 – EB se dvěma získanými konturami odlišnými postupy segmentace (vlevo), ukázka hranice dalšího EB (vpravo).	112
Obrázek 8.21 – Princip eliminace opticky tenkých úseků na okraji EB metodou zvýšené intenzity jasu průchozího světla (vlevo). Vzniklý obraz z relativně jasnou souvislou hranicí, na kterou poukazuje šipka ve snímku. Okolní pixely jsou přesaturované.	112
Obrázek 8.22 – Ukázka značně rozrostlých kultivovaných iPSC-CM, kde metoda detekce hranice objektu většinou ztrácí na účinnosti.	113
Obrázek 8.23 – Snímek pořízený na mikroskopu s kamerou Zyla 5.5 bez průchozího světla se zapnutým laserem (IR) rozptýleným na držáku hrotu AFM. Snímek je v rozlišení 1700 x 1700 px. Bylo použito optické zvětšení 20X.	113
Obrázek 8.24 – Sada šesti vybraných snímků z videosekvence demonstrující změny, které v oblasti nastávají.	114
Obrázek 8.25 – Ukázka signálů získaných KLT (červená a modrá křivka) a zelenou přerušovanou křivkou je zobrazen signál získaný sumou pixelů z oblasti vyznačené na	115
Obrázek 8.26 – Snímek s vyznačenou oblastí zájmu, ze které probíhala extrakce signálu.	115
Obrázek 8.27 – Jeden ze snímků sekvence s vyznačenými oblastmi zájmu.	116
Obrázek 8.28 – Získaný signál (vlevo) s vyznačenými vybranými body a související sekvence snímků z ROI2 v těchto časech (vpravo).	117
Obrázek 8.29 – Společný úsek signálů AFM a pak získaných opticky ze dvou odlišných oblastí.	117
Obrázek 8.30 – Porovnání signálů AFM a signálů z ROI1 a ROI2 získaných optickou metodou.	117
Obrázek 8.31 – Srovnání amplitud detekovaných špiček signálu AFM se signály z ROI1 a ROI2.	118
Obrázek 8.32 – Histogram period detekovaných špiček ve srovnání s AFM.	118
Obrázek 9.1 – Pracoviště zahrnující fluorescenční mikroskop IX-71 s optickým adaptérem určeným pro rozbočení výstupního světla na dvě kamery a kamery Andor iXon Ultra 897 a Andor iXon 860.	122
Obrázek 9.2 – Zorné pole se skupinou tvarově vyhovujících (protáhlých s výraznou charakteristickou strukturou) a viabilních kardiomyocytů spolu s již mrtvými kardiomyocyty. Snímek je pořízen konfokálním mikroskopem Leica TCS SP8X s vysokým rozlišením 3200x3200 px ve světlém poli spolu s fluorescenčním snímkem s kardiomyocyty obarvenými Calceinem. 1 – mrtvý kardiomyocyt, 2 – kardiomyocyt tvarově i viabilně vyhovující, 3 – kardiomyocyt prostorově natočený, 4 – kardiomyocyt vyhovující tvarem ale s nízkou úrovní viability, 5 – překryté kardiomyocyty. Vhodnou skupinou pro další analýzu jsou kardiomyocyty značené 2.	123

Obrázek 9.3 – Navržený algoritmus pro eliminaci pozadí a nalezení kontury sledovaného kardiomyocytu. Dodatek s písmeny u některých bloků označuje odpovídající snímek na Obrázek 9.4.	124
Obrázek 9.4 – Obrázek demonstrující postup v algoritmu uvedeném na Obrázek 9.3. Snímek A byl pořízen na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8 X s využitím kontrastní metody DIC v rozlišení 1600x800 px.	124
Obrázek 9.5 – Aplikace metody aktivních kontur pro nalezení kontury sledovaného kardiomyocytu (a), výsledný signál před filtrací extrahovaný jako součet pixelů uvnitř nalezené kontury v 5s úseku. Postup byl publikován v [67]	125
Obrázek 9.6 – Fluorescenční snímek kardiomyocytu pořízený kamerou Andor iXon 860 s rozlišením 128x128 px. Snímek obsahuje maximální fluorescenci vápníkového transientu s využitím vápníkového indikátoru Fluo-4. Napravo je ukázka získaného normalizovaného signálu vápníkových transientů (celkem 4 cykly) bez filtrace signálu.	126
Obrázek 9.7 – Principiální schéma postupu a použitých algoritmů při současném měření kontrakce izolovaných srdečních buněk spolu s vápníkovými transienty.	126
Obrázek 9.8 – Schéma pro současné měření kontrakce a vápníkových transientů s využitím jedné kamery a optického adaptéru realizujícího spektrální rozdělení a zpětné promítnutí dvou obrazů na jeden čip kamery. .	127
Obrázek 9.9 – Kardiomyocyt pořízený na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8 X v rozlišení 1600x800 px (případně s užším výřezem) s různou rovinou zaostření a pomocí DIC. Napravo je zobrazen pravý konec kardiomyocytu a nespojitě či málo kontrastní úseky. A – sarkolema v případě zaostření na úroveň kardiomyocytu, B – sarkolema při zaostření pod úroveň kardiomyocytu, C – sarkolema při zaostření nad úroveň kardiomyocytu.	128
Obrázek 9.10 – Snímek kardiomyocytu se zaostřením nad hlavní optickou rovinu pořízený mikroskopem Leica TCS SP8 X v konfokálním režimu. Přes kardiomyocyt je přetažena úsečka (zeleně), které odpovídá níže uvedený profil pixelů v úsečce. Spojnicová čára vyznačuje hodnoty pixelů v rozsahu celé úsečky s hodnotami v rozsahu od 0 do 255, červená přerušovaná přímka obsahuje jejich průměrnou hodnotu (vyznačenou v celém rozsahu úsečky).	129
Obrázek 9.11 - Snímky kardiomyocytu se zaostřením nad základní úroveň (vlevo), na základní úroveň (uprostřed) a pod tuto úroveň (vpravo).	129
Obrázek 9.12 – Schéma základní verze metody pro detekci konců z využitím získání profilu úsečky a nalezením konců v signálu.	130
Obrázek 9.13 – Úsek získaného signálu kontrakce detekcí konců v délce zhruba 7 sekund.	130
Obrázek 9.14 – Mikroskopický snímek se skupinou kardiomyocytů. Vlevo fluorescenční snímek s buňkami obarvenými Calceinem, vpravo zobrazení ve světlém poli.	132
Obrázek 9.15 – Kardiomyocyt umístěný v Tyrodově roztoku obarvený Calceinem o výsledné koncentraci 4 μM	133
Obrázek 9.16 – Výškový profil fluorescenčního snímku (vlevo) vygenerovaný z šedotónového snímku (Obrázek 9.15). Horizontální osy znázorňují velikost v pixelech, vertikální osa znázorňuje hodnotu pixelů. Vpravo je uveden histogram shodného snímku.	133
Obrázek 9.17 – A – originální obrázek pořízený kamerou Andor iXon 860 v rozlišení 128x128 px. B – výřez snímku bez nežádoucích objektů na pozadí určený pro analýzu – v případě relaxace, C – v případě kontrakce. D – nalezená kontura kardiomyocytu.	134
Obrázek 9.18 – Signál kontrakce získaný ze změny obsahu plochy, 64s záznam (nahore).	135
Obrázek 9.19 – Signál kontrakce získaný ze změny vzdálenosti konců, 64s záznam (nahore).	135
Obrázek 9.20 – Signál kontrakce získaný ze změny kulatosti objektu, 64s záznam (nahore).	136
Obrázek 9.21 – Signál kontrakce získaný z délky hlavní osy aproximující elipsy, 64s záznam (nahore).	136
Obrázek 9.22 – Signál kontrakce získaný ze změny nalezené kontury, 64s záznam (nahore).	137
Obrázek 9.23 – Histogram vypočtených frekvencí špiček pro vzdálenost konců a pro kulatost měřeného objektu.	138
Obrázek 9.24 – Mikroskopický snímek v rozlišení 1800x1800 px pořízený na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8X. Jedná se o současné zobrazení živých a mrtvých kardiomyocytů obarvených barvivu Di-4-ANEPPS a Calcein spolu se zobrazením morfologie buněk ve světlém poli.	139

Obrázek 9.25 – Mikroskopický snímek pořízený na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8X se značením sarkolemy fluorescenční značkou DiO. Vlevo celý snímek, vpravo výřez (980x980 px). Šípky ukazují na dvě části sarkolemy, která je velmi slabě značena (vykazuje velmi malou fluorescenci) a na nespojitý, relativně dlouhý, úsek sarkolemy.	139
Obrázek 9.26 – Příklad detekce kontury kardiomyocytu s využitím algoritmu (Obrázek 9.3, str. 124). Levý snímek ukazuje nalezenou konturu v případě ručního, velmi přesného nastavení. Červená barva značí konturu získanou při použití segmentace na základě hranové detekce, zelená při použití segmentace při použití segmentace s prostým prahováním. Prostřední a pravý snímek zobrazují časté případy chybné detekce vzhledem ke vzniklým nespojitostem značení sarkolemy.	140
Obrázek 11.1 – Signály vápníkových transientů normalizované do rozmezí 0 – 1 získané ze čtyř odlišných oblastí zájmů.	162
Obrázek 11.2 – Detekované špičky ze signálů z Obrázek 11.1 zobrazené jako body propojené spojnicí. Z křivek lze sledovat jejich variabilitu v čase a v některých případech jsou názorné lokální výkyvy mimo běžný průběh.	163

Seznam zkratek

SR – sarkoplasmatické retikulum

AFM – mikroskopie atomárních sil

SERCA – ER Ca^{2+} ATPáza, pumpa, která se vyskytuje na membráně sarkoplasmatického retikula

IR – infračervená oblast spektra

NW – no wash, vlastnost barviva Fluo, kdy není nutné propláchnutí barviva

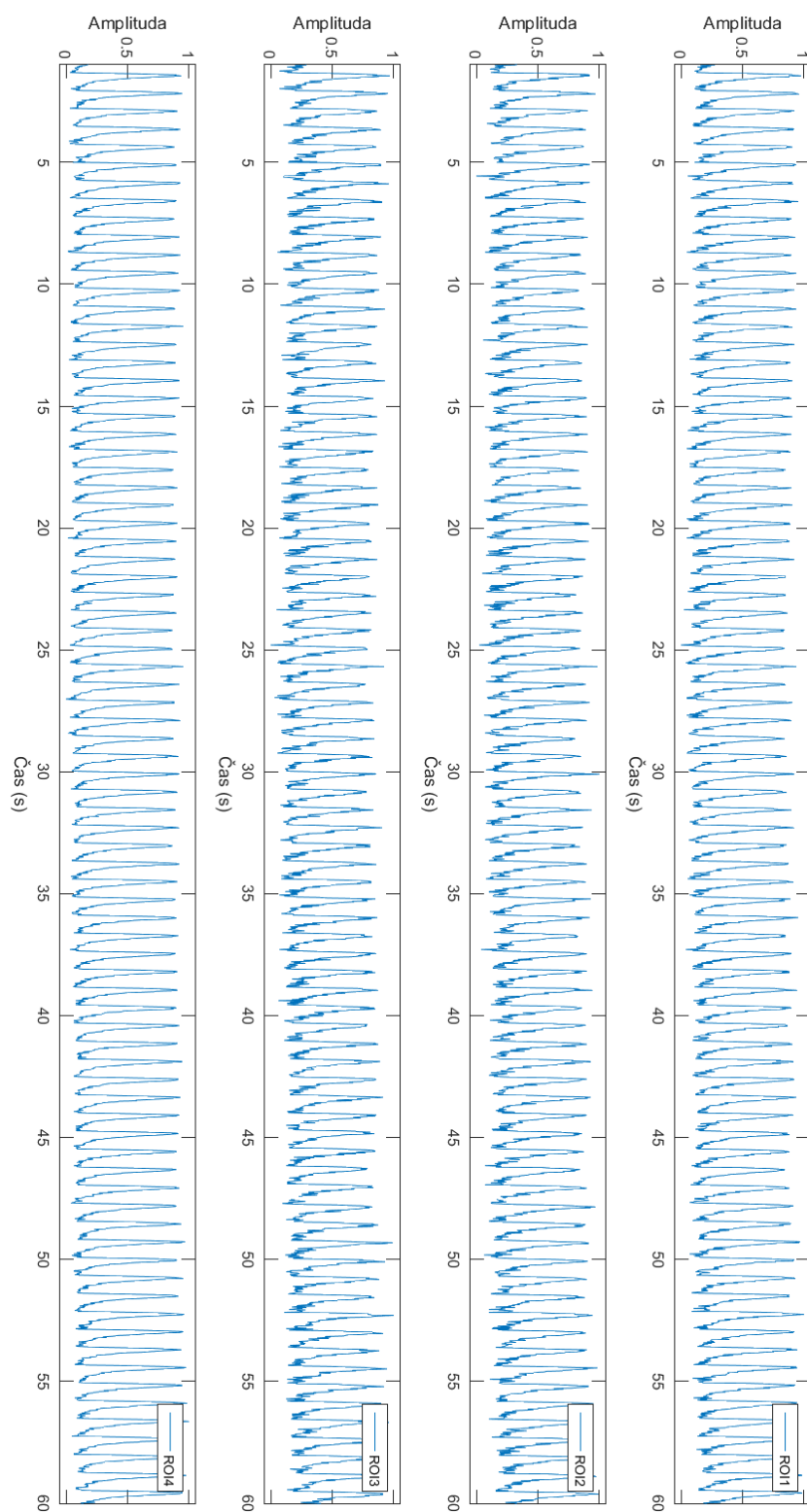
iPSC-CM – kardiomyocyty indukované z pluripotentních kmenových buněk

EB – embryoidické těleso

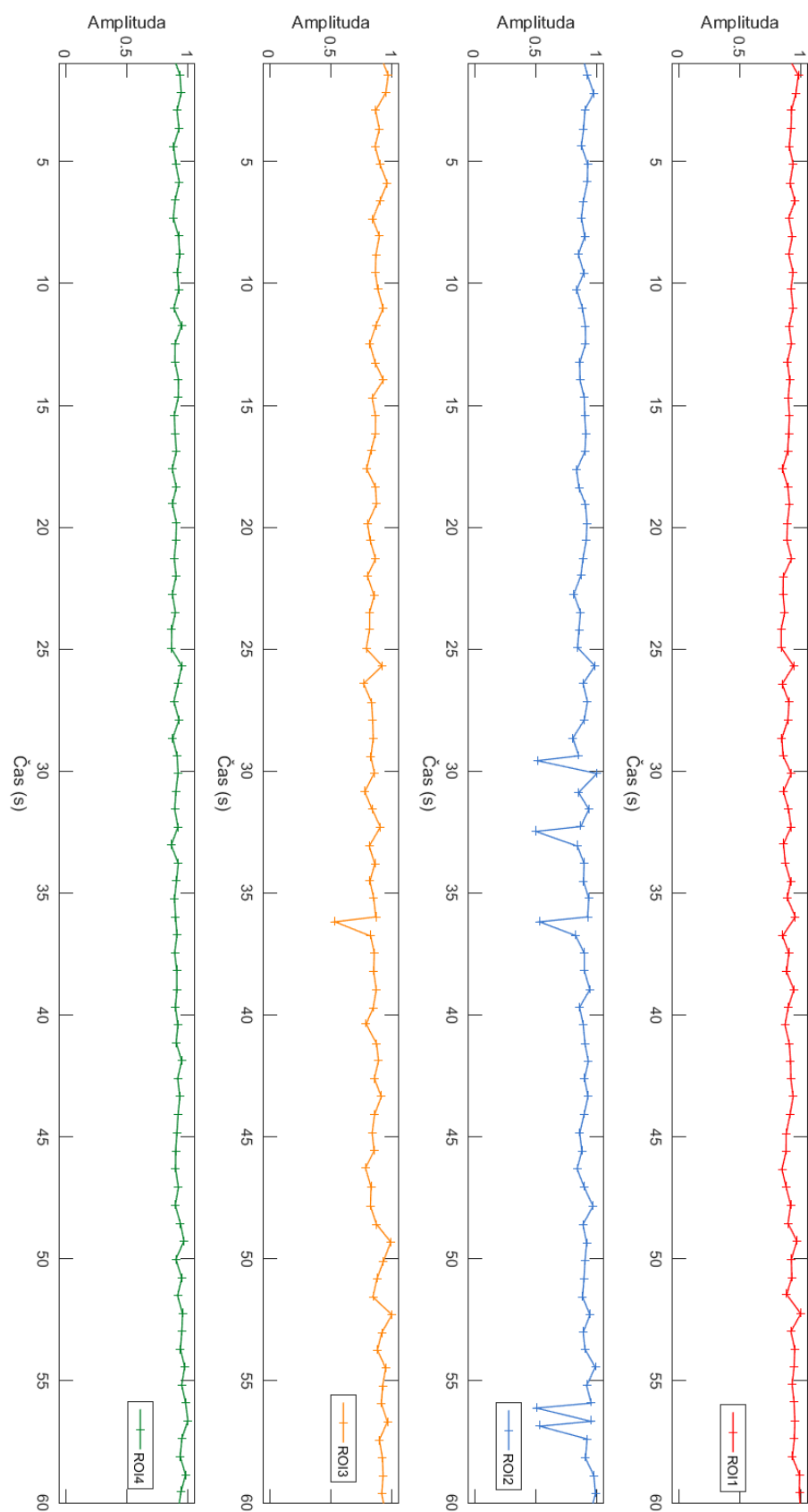
RyR – ryanodinový receptor sarkoplasmatického retikula

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ – koncentrace vápníkových iontů v intracelulárním prostředí

Příloha 1



Obrázek 11.1 – Signály vápníkových transientů normalizované do rozmezí 0 – 1 získané ze čtyř odlišných oblastí zájmů.



Obrázek 11.2 – Detekované špičky ze signálů z Obrázek 11.1 zobrazené jako body propojené spojnici. Z křivek lze sledovat jejich variabilitu v čase a v některých případech jsou názorné lokální výkyvy mimo běžný průběh.